Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg
Direktor: Professor Dr. G. A. Martini

BESTIMMUNG VON CHYMOTRYPSIN UND TRYPSIN IM STUHL ALS SUCHTEST FÜR EINE EXOKRINE PANKREASINSUFFIZIENZ:

UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODISCHEN BRAUCHBARKEIT UND KLINISCHEN WERTIGKEIT DES TESTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Reinhold Schneider
aus Frankenberg/Eder

Marburg/Lahn 1976

1978

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg
Direktor: Professor Dr. G. A. Martini

BESTIMMUNG VON CHYMOTRYPSIN UND TRYPSIN IM STUHL ALS SUCHTEST FÜR EINE EXOKRINE PANKREASINSUFFIZIENZ:

UNTERSUCHUNGEN ZUR METHODISCHEN BRAUCHBARKEIT UND KLINISCHEN WERTIGKEIT DES TESTES

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Reinhold Schneider
aus Frankenberg/Eder

Marburg/Lahn 1976

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg am 15.12.1978

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Professor Dr. Oepen
Peferent: Professor Dr. J. Ch. Bode
Correferent: Professor Dr. D. Maroske

Meinen Eltern
in Dankbarkeit

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546807_0041

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S :

	A.	Einleitung	S. 1
	B.	Materialien, Methoden und Patienten	S. 3
1.		Materialien	S. 3
1.1		Stuhlhomogenat	S. 3
1.2		Puffer und Substrate für CT-Bestimmung	S. 3
1.3		Puffer und Substrate für T-Bestimmung	S. 4
1.4		Rinderenzymlösung	S. 4
1.5		Duodenalsaft	S. 4
1.6		orale Pankreasfermentpräparate	S. 4
2.		Methoden	S. 5
2.1		Titrimetrische Bestimmung der CT-Aktivität	S. 5
2.2		Titrimetrische Bestimmung der T-Aktivität	S. 5
2.3		Sekretin-Pankreozymin-Test (S-P-T)	S. 6
2.4		Bestimmung der Fettausscheidung im Stuhl	S. 6
2.5		Zentrifugation	S. 6
3.		Patienten	S. 7
3.1		Kontrollgruppe	S. 7
3.2		Patientengruppe	S. 7
3.2.1		exokrine Pankreasinsuffizienz	S. 7
3.2.2		exokrine Pankreasfunktion sicher normal	S. 7
3.2.3		Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz	S. 7
3.2.4		Erkrankungen der Gallenwege	S. 7
3.2.5		Lebererkrankungen	S. 7
3.2.6		Morbus Crohn	S. 8
3.2.7		Sprue-Syndrom	S. 8
3.2.8		Magenresektion	S. 8
3.2.9		verschiedene sonstige gastroenterologische Erkrankungen	S. 8
3.2.10		Psoriasis	S. 8
	C.	Ergebnisse	S. 8
1.		Ergebnisse der Untersuchungen zur Methode	S. 8
1.1		pH-Abhängigkeit	S. 8
1.2.		Michaelis-Menton-Konstante	S 11
1.3		Linearität	S 12
1.4		Aktivitätsverteilung im Stuhlhomogenat	S.13
1.5		Haltbarkeit der Enzyme im Stuhl	S.15
1.6		Zuverlässigkeit der titrimetrischen Methode	S.16
2.		Ergebnisse der klinischen Untersuchungen	S.18
2.1		Normalwerte	S.18

2.2		Altersabhängigkeit	S. 19
2.3		Einfluß der Substitutionstherapie	S. 20
2.4		Patienten	S. 22
2.4.1		exokrine Pankreasinsuffizienz	S. 22
2.4.2		Pankreasfunktion sicher normal	S. 26
2.4.3		Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz	S. 27
2.4.4		Erkrankungen der Gallenwege	S. 27
2.4.5		Lebererkrankungen	S. 29
2.4.6		Sprue-Syndrom	S. 30
2.4.7		Magenresektion	S. 30
2.4.8		M. Crohn	S. 31
2.4.9		verschiedene sonstige gastroenterologische Erkrankungen	S. 31
2.4.10		Psoriasis	S. 32
2.5		Korrelation von CT und T im Stuhl	S. 32
2.6		Untersuchung mehrerer Stuhlproben eines Patienten	S. 32
2.7		Vergleich der CT- mit der Fettausscheidung im Stuhl	S. 35
	D.	Diskussion	S. 37
1.		Zur Durchführung des Testes	S. 37
1.1		Stuhlproben	S. 37
1.2		Lagerung der Proben	S. 38
1.3		Homogenisation	S. 38
1.4		Filtration	S. 39
1.5			S. 39
1.6		pH-stat-Titration	S. 39
2.		Untersuchungen zur methodischen Brauchbarkeit	S. 40
2.1		Ursprung des CT im Stuhl	S. 40
2.2		Linearität	S. 41
2.3		Meß-pH	S. 41
2.4		Partikelbindung	S. 42
2.5		Haltbarkeit	S. 43
2.6		Präzision der Methode	S. 45
2.7		Enzymsubstitutionstherapie	S. 45
3.		Klinische Anwendung	S. 46
3.1		Normalwerte	S. 46
3.1.1		Altersabhängigkeit	S. 46
3.1.2		Verteilungstyp d. Enzymkonzentrationen im Normalkollektiv	S. 47
3.1.3		Vorgehen bei der Definition der Normalgrenzen	S. 47
3.1.4		Einfluß der Enzymaktivität	S. 48
3.1.5		Vergleichbarkeit der Normalkollektive verschiedener Untersucher	S. 48
3.1.6		Def.: "falsch-normal" und "falsch-pathologisch	S. 52
3.2		Treffsicherheit der Stuhlenzymbestimmungsmethode	S. 52
3.2.1		Überblick über die Treffsicherheit der Methode in der vorliegenden Untersuchung	S. 52

3.2.2 Stuhl-CT bei Pankreaserkrankungen S. 53
3.2.3 Stuhl-CT bei weiteren Erkrankungen S. 57
3.2.4 Wert der T-Bestimmung S. 59
3.2.5 Doppelbestimmungen S. 60
3.2.6 Verdauungskontrollen S. 61
3.2.7 Fettbilanz und Stuhl-CT S. 61

4. Schluß S. 62

E. Zusammenfassung S. 64

1. Methodische Probleme der CT-Bestimmung S. 64
2. Analoge Untersuchungen zur Problematik der T-Bestimmung S. 64
3. Klinische Ergebnisse der Stuhl-enzymbestimmung S. 65

Literaturverzeichnis S. 66

Danksagung I

Lebenslauf II

Verzeichnis der akademischen Lehrer III

ABKÜRZUNGEN:

A.-L.	: Amylase-Einheit
ATEE	: N-Acetyl-tyrosyl-äthylester
BTEE	: N-Benzoyl-L-Tyrosinäthylester
CT	: Chymotrypsin
E	: Einheit
g	: Erdbeschleunigung
H.E.	: Hunde-Einheiten
IE	: Internationale Einheit
IU	: IE, International Unit
K_m	: Michaelis-Menton-Konstante
L.-E.	: Lipase-Einheit
M	: Mol = Molekulargewicht in Gramm
P.-E.	: Proteinasen-Einheit
Peptid-PABA	: N-Benzoyl-L-Tyrosyl-p-Aminozolsäure
PZ-CCK	: Pankreozymin / Cholecystokinin
s	: Standardabweichung
δ	: = s
S-P-T	: Sekretin-Pankreozymin-Test
T:	: Trypsin
TAME	: p-Toluol-sulfonyl-L-Arginin-methylester
Tris	: Tris-hydroxymethyl-aminomethan
U/min	: Umdrehung pro Minute

A. Einleitung:

Neben Anamnese und Erhebung des klinischen Befundes werden in der Diagnostik von Pankreaserkrankungen laborchemische, röntgenologische, radioimmunologische, cytologische, szintigrafische, endoskopische, histologische (49) und sonografische Verfahren angewandt.

Die "klassischen" laborchemischen Untersuchungsmethoden sind die Stuhlfettbestimmung (51) und der Sekretin-Pankreozymin-Test (S-P-T). Die Stuhlfettbestimmung ist nicht pankreasspezifisch, sondern fällt z. B. auch bei Malabsorption pathologisch aus. Dagegen stellt der S-P-T nach allgemein verbreiteter Auffassung zur Zeit das beste Kriterium zur Beurteilung der exokrinen Pankreasfunktion dar. Diese Untersuchungstechnik ist jedoch nicht unproblematisch. Nicht bei allen Patienten gelingt die belastende Sondierung des Duodenum. Die Standardisierung der Methode steht noch aus, und nicht zuletzt bedeutet der hohe technische, personelle und finanzielle Aufwand eine für viele Laboratorien unüberwindliche Barriere.

Aus diesem Grunde wurden in neuerer Zeit verschiedene einfache Methoden zur Prüfung der exokrinen Pankreasfunktion entwickelt. Hierbei bringt der Se-Methionin-Test (57) gegenüber dem S-P-T keine wesentliche Verminderung des technischen Aufwandes und der Belastung des Patienten. Seine klinische Brauchbarkeit kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Der Fluorescein-Test (28) und der PABA-Test(9) sind technisch wesentlich einfacher. Jedoch ist der Fluorescein-Test wegen der nicht ausreichenden Lipase-Spezifität des Subtrates unbefriedigend. Gute klinische Ergebnisse werden dagegen vom PABA-Test berichtet (9). Er ist jedoch Störungen durch zahlreiche Arzneimittel ausgesetzt, die mit der Bestimmung des PABA im Urin interferieren. Zusätzliche Probleme bringt die Notwendigkeit mit sich, den Urin über längere Zeit quantitativ zu sammeln. Schließlich ist noch

ungeklärt, welchen Einfluß eine Niereninsuffizienz auf das Testergebnis ausübt.

Die Chymotrypsinbestimmung im Stuhl zeichnet sich demgegenüber durch äußerst geringe Belastung des Patienten und technische Einfachheit aus. Bereits zu Beginn unseres Jahrhunderts (44) wurde versucht, die Bestimmung der tryptischen Aktivität im Stuhl zur Diagnostik von Pankreaserkrankungen zu gebrauchen (Zusammenstellung von Lit. s. bei Ammann (4)). Aus Mangel an spezifischen Substraten blieben die Ergebnisse jedoch unbefriedigend, auch wenn bis in neuere Zeit hinein der sog. Gelatinetest in der Pädiatrie Verwendung fand.

Ein entscheidender Fortschritt wurde erst erzielt, als Grossmann 1962 (25) die von Schwert und Neurat (48, 37) entwickelten Substrate für die fäkale Enzymbestimmung einsetzten. Erste sehr positive klinische Ergebnisse wurden von Haverback (27) berichtet.
Banwell (7) und Wilding (53) zweifelten die Brauchbarkeit des Testes zunächst an. Jedoch wurden die ursprünglichen Befunde von Haverback zunächst von Ammann (6,5,4) und später von vielen anderen Autoren bestätigt (50, 34, 33, 32, 16, 17, 11, 18, 8, 35). Trotz dieser zahlreichen positiven Berichte fand dieser Test in der Klinik nur geringe Beachtung. Übersieht man die relativ große Zahl von Veröffentlichungen, die sich mit der klinischen Brauchbarkeit der Methode befassen, so ist erstaunlich, wie wenig über die methodischen Probleme dieser Untersuchungstechnik bekannt ist.
Aufgabe dieser Arbeit soll es daher sein, die Probleme der Bestimmungsmethode und die klinische Brauchbarkeit der Enzymnbestimmung im Stuhl zu untersuchen.

B. Materialien, Methoden und Patienten:

1. Materialien:

1.1 Stuhlhomogenat:

Wir verwenden Stuhlproben von 3-5 g. Zur Entnahme und geruchsfreien Lagerung der Probe benutzen wir kleine Kunststoffröhrchen. Der Deckel ist mit einem Löffel aus einem Stück gearbeitet. Ein Gewichtsteil Stuhl (etwa 1 g auf 0,05 g genau eingewogen) wird mit 9 Gewichtsteilen physiol. Kochsalzlösung verdünnt. Das Gemisch wird in einer Eis-Salz-Mischung gekühlt und in einem "Ultra-Turrax" (Jahnke und Kunkel, Staufen i. Br.) bei etwa 12000 U/min zweimal je 90 sec. homogenisiert. Die Umdrehungszahl wurde durch einen Drehwiderstand (Jahnke und Kunkel) bei Stellung 7 festgelegt. Ohne vorgeschalteten Widerstand leistet der verwendete Ultraturrax bei 220 V 24000 U/min. Die Scala des verwendeten Drehwiderstandes bietet 10 Markierungen in gleichem Abstand um den Mixer zwischen 24000 und 0 U/min einzuregeln. Daß 12000 U/min. bei Stellung 7 erreicht werden, entspricht einer groben Schätzung.

Eine Zwischenkühlung von Homogenat und Homogenisator nach den ersten 90 sec. ist notwendig. Das Homogenat wird anschließend durch eine doppelte Lage von Verbandsgaze filtriert.

1.2 Puffer und Substrate für CT-Bestimmung:

"Puffer zur CT-Bestimmung" (0,005 M Tris (Merck No. 8382) 0,5 M NaCl; 0,005 M $CaCl_2$). -"Tris-Reagenz" (0,001 M Tris (Merck No. 8382) in H_2O). - "ATEE-Lösung" (0,0335 M N-Acetyl-tyrosyl-äthylester (Merck No. 83), gelöst in Tris-Reagenz/Methanol 1:1 (v/v)). Alle Lösungen werden mit 1 N NaOH auf pH 9.0 eingestellt.

1.3 Puffer und Substrate für T-Bestimmung:

"Puffer zur T-Bestimmung" (0,005 M Tris (Merck No. 8382); 0,04 M Na Cl; 0,02 M $CaCl_2$ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)).- pH: 9,0 "TAME-Lösung" (0,1 M p-Toluol-sulfonyl-L-Arginin-methylester (Merck, Darmstadt)), gelöst in "Puffer für T" mit 1n NaOH auf pH 9.0 eingestellt.

1.4 Rinderenzymlösung:

Verwendet wurden Lösungen von CT vom Rind 3x krist. (Fa. Roth, Karlsruhe) in "Puffer für CT" gelöst. Trypsin vom Rind 2x krist. (Fa. Roth, Karlsruhe) wurde in "Puffer für T" gelöst.
Wurden die Lösungen nicht sofort verbraucht, so wurden sie als hochkonzentrierte Stammlösungen in kleinen Portionen bei - 20°C eingefroren.

1.5 Duodenalsaft:

Duodenalsaft wurde während des routinemäßig durchgeführten S-P-T (26) gewonnen. Wir verwendeten Säfte der Fraktionen, die während der kontinuierlichen, simultanen Stimulierung durch Sekretin 1 E/kg/h und PZ-CCK 1 E/kg/h gewonnen wurden (siehe auch unter B.2.3.).

1.6 orale Pankreasfermentpräparate:

Die zur oralen Substitution verwandten Präparate hatten folgende Zusammensetzung:

a) Pankreon forte ^{R}: 700 mg Pankreatin (28000 Lipase E., 22000 Amylase-E., 1500 Protease-E., 75 mg Fel.Tauri. depurat.sicc.).
b) Ozym^R: 400 mg Pankreati, 4fach NF XII (10000 P.-E., 6000 A.-E., 8000 L.-E.).

2. Methoden:

2.1 Titrimetrische Bestimmung der CT-Aktivität:

Der Testansatz enthält 2,5 ml ATEE-Lösung sowie je nach Aktivität zwischen 0,1 und 1,0 ml Stuhlhomogenat. Die Menge des eingesetzten Homogenates wird von der Auswertbarkeit der Schreiberkurven bestimmt. Weder zu steile noch zu flache Kurven sind exakt auswertbar. Unter unseren Bedingungen sind Kurven mit Steigungen von 5-30 mm/2 min gut zu gebrauchen. Weiterhin ist zu beachten, daß die Homogenate vor Entnahme der zur Reaktion benötigten Menge sorgfältig durchgeschüttelt werden müssen.
Mit "Puffer für CT" wird auf ein Volumen von 6,5 ml aufgefüllt. Die titrimetrische Bestimmung der Enzymaktivität erfolgt nach dem pH-stat-Verfahren im "Autotitrator" (Fa. Radiometer, Kopenhagen). Mit 1n NaOH wird zunächst der pH des Reaktionsgemisches auf ca. 8.7 eingestellt und dann mit der Autobürette mit 0,1 n NaOH bis zum endgültigen Meß-pH von 9.0 titriert. Aus der bei pH 9.0 und 25°C fortlaufend verbrauchten NaOH-Menge läßt sich direkt die im Testansatz vorhandene Enzymmenge berechnen und in internationalen Einheiten angeben.

2.2 Titrimetrische Bestimmung der T-Aktivität:

Die T-Bestimmungsmethode entspricht weitgehend der des CT. Hier werden 1,24 ml TAME-Lösung verwandt und je nach Aktivität 0,2-2,0 ml Stuhlhomogenat eingesetzt. Das Volumen von 6,5 ml wird dann durch Zugabe der entsprechenden Menge "Puffer für T" erreicht. Meß-pH und Meß-Temperatur entsprechen denen der CT-Bestimmung.

Vor Enzymbestimmung werden tiefgekühlte und frisch homogenisierte Proben zunächst ca. 30 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. (Nach einer Empfehlung von Ammann (4)). Grundsätzlich wird jede Bestimmung in demselben Homogenat zweimal durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

2.3 Sekretin-Pankreozymin-Test (nach dem Vorschlag für eine Gemeinschaftsstudie im Rahmen des European Pancreatic Club (26)):

Eine dreilumige, modifizierte Sonde nach Lagerlöff (30) wird unter Röntgen-Kontrolle in das Duodenum gelegt. Nach 30 min Vorperiode Stimulation mit 1 klin. E Sekretin/kg. 60 min. (Karolinska Institut , Stockholm) pro kg Körpergewicht. Sammlung des Duodenalsaftes in sechs 10-min-Fraktionen. Anschliessend über 60 min Infusion eines Gemisches von Sekretin und Pankreozymin (Karolinska Institut, Stockholm; 1 klin. E Sekretin/kg·60 min, 1 H.E. Pankreozymin/kg·60 min). Sammlung des Duodenalsaftes in weiteren sechs 10-min-Fraktionen. Bestimmung des Saftvolumens und der Ausscheidung von Bicarbonat, Gesamtprotein, Lipase, Amylase, Trypsin und Chymotrypsin. Kontrolle der quantitativen Saftgewinnung mit ^{69}Co-markiertem Vitamin B_{12}. Das Magensekret wird während der ganzen Untersuchung laufend abgesaugt.

2.4 Bestimmung der Fettausscheidung im Stuhl:

Sammlung des Stuhls über drei Tage. Anschließend quantitative Stuhlfettbestimmung nach van de Kamer (51).

2.5 Zentrifugation:

Bis zu einer Zentrifugalbeschleunigung von 10000 x g verwendeten wir eine Sorvall-Kühlzentrifuge vom Typ: Sorvall Superspeed RC-2, Automatic Refrigerated Centrifuge. Zentrifugationen über 10000 x g bis zu 100000 x g führten wir in einer Beckmann-Ultrazentrifuge aus (Typ: L265 B).

3. Patienten:

3.1 Kontrollgruppe:

12 klinisch gesunde Studenten und Angehörige des Klinikpersonals und 43 Patienten. Bei den letztgenannten fand sich anamnestisch, sowie aufgrund des klinischen Befundes und der klinisch chemischen Untersuchungen kein Hinweis auf eine Erkrankung des exkretorischen Pankreas. Das mittlere Alter der Gruppe betrug 49 Jahre (20 - 85 Jahre).

3.2 Patientengruppe:

Aufgrund der abschließenden Diagnosen nach längerem stationärem Aufenthalt ließen sich folgende Untergruppen aus den 123 Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen und 8 Patienten mit Psoriasis zusammenstellen:

3.2.1 "exokrine Pankreasinsuffizienz", gesichert durch eindeutig pathalogischen Ausfall des Sekretin-Pankreozymin-Test (S-P-T). (13 Patienten; Alter 27 - 63 Jahre, im Mittel 38 Jahre).

3.2.2 "exokrine Pankreasfunktion sicher normal", das heißt, Patienten mit eindeutig normalem Ausfall des S-P-T. (13 Patienten; Alter 30 - 60 Jahre, im Mittel 44 Jahre).

3.2.3 "Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz", das heißt, Patienten, bei denen dieser Verdacht klinisch geäußert wurde, bei denen aber ein S-P-T nicht durchgeführt werden konnte (6 Patienten; Alter 32 -67 Jahre, im Mittel 51 Jahre).

3.2.4 "Erkrankungen der Gallenwege", also Patienten mit Verschlußikterus, Cholelithiasis, Choledochusstenose, Zustand nach Cholezystektomie (18 Patienten; Alter 21 - 73 Jahre, im Mittel 53 Jahre).

3.2.5 "Lebererkrankungen", das heißt, Patienten mit Leberzirrhose, alkoholischer Fettleber, Leberbeteiligung bei Toxoplasmose, Hämochromatose, Leberzellkarzinom, chronisch

persistierender Hepatitis, Alkoholhepatitis (22 Patienten; Alter 20 - 72 Jahre, im Mittel 48 Jahre).

3.2.6 "Morbus Crohn" (6 Patienten; Alter 19 - 36 Jahre, im Mittel 27 Jahre).

3.2.7 "Sprue-Syndrom" (6 Patienten; Alter 32 - 65 Jahre, im Mittel 50 Jahre; plus ein Patient aus der Gruppe "exokrine Pankreasfunktion sicher normal").

3.2.8 "Magenresektion", das heißt, Patienten mit Zustand nach Billroth I und Billroth II (12 Patienten; Alter 29 - 74 Jahre, im Mittel 60 Jahre).

3.2.9 "verschiedene sonstige gastroenterologische Erkrankungen", darunter sind Patienten mit Ulcus ventriculi, Ulcus duodeni, atrophische Gastritis, Magenausgangsstenose, unklarem Erbrechen, Gastroenteritis, Zustand nach Ilesosteomie, Colitis ulcerosa, Colon irritabile, Anorexia nervosa, aktue Pankreatitis (27 Patienten; Alter 15 - 75 Jahre, im Mittel 43 Jahre).

3.2.10 "Psoriasis", (8 Patienten aus der Universitäts-Hautklinik, Marburg).

C. Ergebnisse:

1. Ergebnisse der Untersuchungen zur Methode:

1.1 pH-Abhängigkeit

Wie in Abb. 1 dargestellt, fanden wir in Stuhlhomogenat, in Duodenalsaft, wie auch in wässriger Lösung von Rinderpankreas-Chymotrypsin relativ flache pH-Optima. In den 3 Stuhlhomogenaten wurde jeweils die größte Enzymaktivität bei pH 9.0 gemessen. Jede Messung wurde 3fach ausgeführt und neben dem Mittelwert auch die Streuung eingezeichnet.

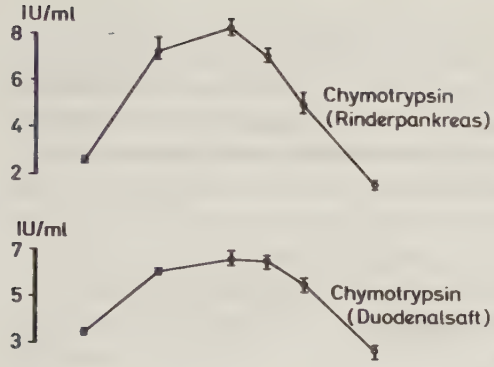
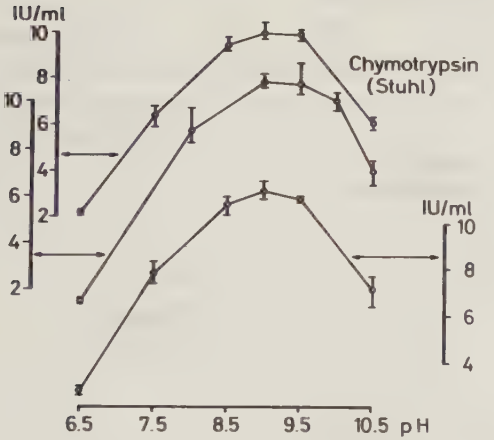


Abb. 1:
CT im Stuhl:
pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität (zum Vergleich sind pH-Abhängigkeit von reiner Rinderenzymlösung und Duodenalsaft-CT eingezeichnet). Dreifachbestimmungen, Mittelwert und Extremwerte.

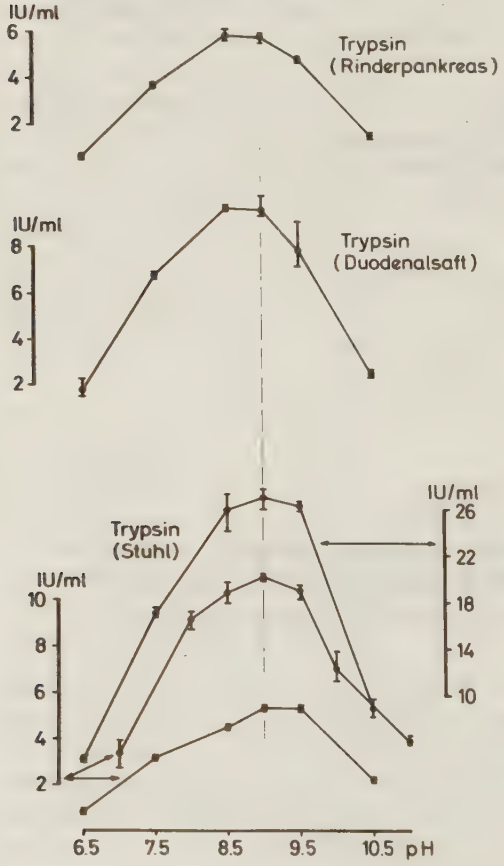


Duodenalsaft und Rinderpankreaschymotrypsin-Lösung zeigen hier in jeweils einer Probe optimale Aktivität im mehr sauren Bereich (Duodenalsaft: pH 8.5; Rinderpankreas-CT: pH 8.5).

Trypsin:

Trypsinbestimmung in Stuhlhomogenat zeigt ebenfalls ein flaches pH-Optimum, dies ist in Abb. 2 an 3 Stuhlhomogenaten dargestellt. Es liegt etwa bei pH 9.0, während Duodenalsaft und Rinderpankreas-Trypsin in wässriger Lösung mehr zum sauren verlagerte pH-Optima aufweisen (pH 8.5).

Abb 2: T im Stuhl:
pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität (zum Vergleich ist pH-Abhängigkeit von reiner Rinder-T-Lösung und Duodenalsaft eingezeichnet), Dreifachbestimmungen, Mittelwert und Extremwerte.

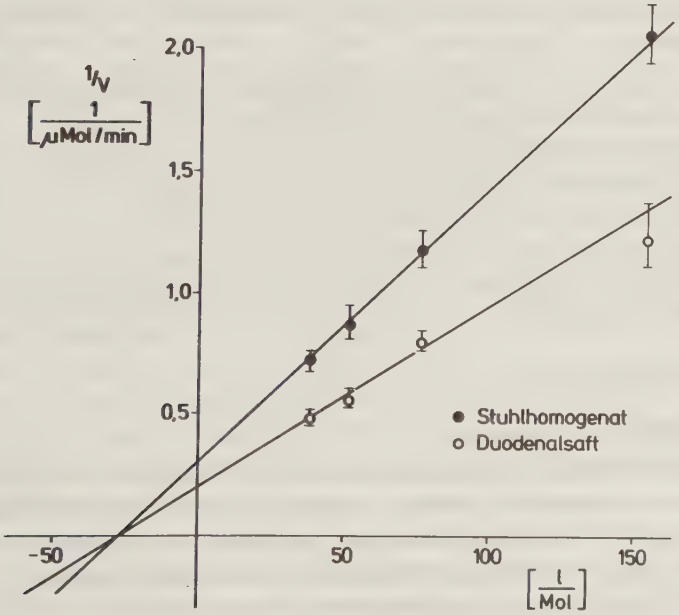


1.2 Michaelis-Menton-Konstante (K_m):

Chymotrypsin:

Abb. 3 zeigt das Lineweaver-Burk-Diagramm für Chymotrypsin in Stuhlhomogenat und Duodenalsaft ein und desselben Patienten. Die ATEE-Konzentration reicht von 0,007 Mol/l - 0,05 Mol/l. Hingegen wurde das Volumen des Testansatzes von 6,5 ml und Methanolmenge pro Ansatz konstant gehalten. Der Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse war für beide Enzyme praktisch identisch. Jede Messung wurde 3fach ausgeführt, eingezeichnet sind Mittelwert und Streubereich.

Abb. 3:
Lineweaver-Burk-Diagramm f. CT aus Stuhl und Duodenalsaft eines Patienten, Dreifachbestimmungen, Mittelwert und Extremwert.



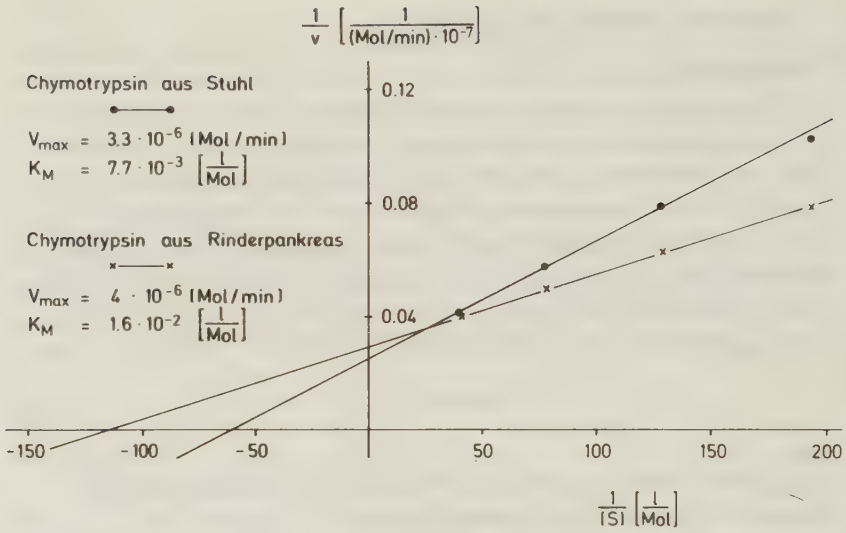


Abb. 4:
Lineweaver-Burk-Diagramm für CT aus menschlichem Stuhl und wässriger Lösung von reinem Rinderchymotrypsin, Einfachgestimmungen

Abb. 4 zeigt ein Lineweaver-Burk-Diagramm für CT des Stuhlhomogenates eines Patienten und CT vom Rind (Fa. Roth, Karlsruhe) in wässriger Lösung. Hier liegen verschiedene Schnittpunkte der Geraden mit der Abszisse vor. Chymotrypsin aus menschlichem Stuhl weist in Abb. 3 einen anderen K_m-Wert ($K_m = 3{,}66 \cdot 10^{-2}$) auf als in Abb. 4 ($K_m = 7{,}7 \cdot 10^{-3}$). Es liegt den Kurven Stuhl von zwei verschiedenen Patienten zugrunde.

1.3 Linearität:

Chymotrypsin:

Für die verwendete Substratkonzentration finden wir im Bereich eines Laugenverbrauches zwischen 2 und 8 µMol NaOH/min ein annähernd lineares Verhalten zur Menge des eingesetzten Enzymes. Als enzymhaltige Lösung haben wir Stuhlhomogenat eines Patienten in Mengen zwischen 0,1 und 2 ml (bei 6,5 ml)

Gesamtvolumen im Reaktionsgefäß) eingesetzt.
Wurde statt Stuhlhomogenat Rinderpankreas-CT-Lösung eingesetzt, so ergab sich eine entsprechend gute Linearität.

Trypsin:
Auch für T besteht lineare Abhängigkeit zwischen der Menge trypsinhaltigen Stuhlhomogenates und dem Laugenverbrauch bei der pH-stat-Titration. Wir fanden eine gute Linearität für Trypsinmengen von 2 IU - 37 IU pro 6,5 ml Reaktionsgemisch dargestellt.
Auch die Aktivität von Rinderpankreastrypsin-Lösung zeigt lineares Verhältnis zum Laugenverbrauch im pH-stat-Verfahren.

1.4 Aktivitätsverteilung im Stuhlhomogenat:

Chymotrypsin:

Homogenate von Stuhlproben willkürlich ausgewählter Patienten wurden über 15 min bei 4°C zunächst mit einer Beschleunigung von 8000 x g zentrifugiert. In den zwar verschieden gefärbten, jedoch klaren Überständen wurde die CT-Aktivität bestimmt. (In einzelnen Proben treten Trübstoffe auf. Sie liegen mit ihrem spezifischen Gewicht bisweilen auch unter dem des 0,9 % Na Cl, so daß sie sich beim Zentrifugieren als Häutchen an der Oberfläche des Überstandes ablagern können.). Wie Abb. 5 zeigt, fanden wir in den Überständen nach 8000 x g-Zentrifugation noch 2-50 % der Aktivität der Gesamthomogenate. Die Gesamthomogenate enthielten CT-Aktivität von 1,2 - 19,0 IU/ml.
15 dieser bei Zentrifugation mit 8000 x g gewonnenen Überstände wurden in einem 2. Arbeitsgang über 15 min bei 100000 x g zentrifugiert. In den so gewonnenen Überständen wurde eine CT Aktivität von 2-30 % der Aktivität des Gesamthomogenates gefunden.

Tab. 1 zeigt an einem Stuhlhomogenat dargestellt, wie CT Aktivität im Überstand nach 15-minütiger Zentrifugation in Abhängigkeit von der Zentrifugalbeschleunigung abnimmt.

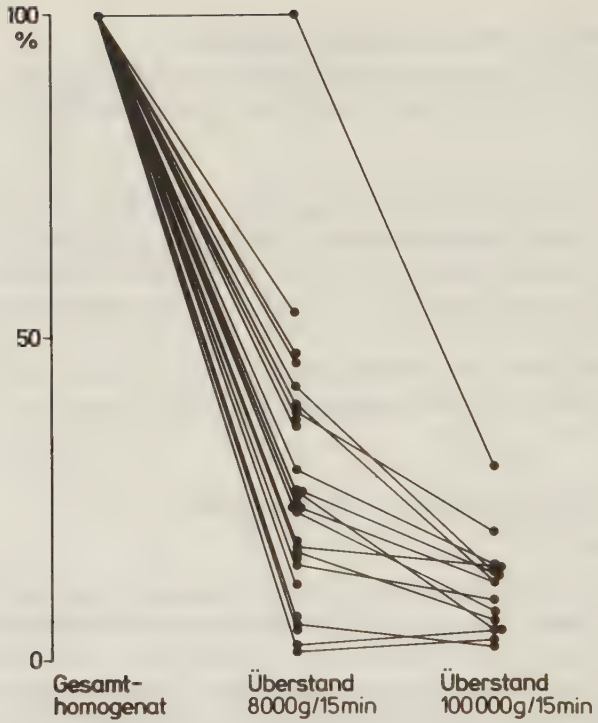


Abb. 5:
Chymotrypsin in Überständen von Stuhlhomogenaten nach Zentrifugation: Die Aktivität des Gesamthomogenats wurde gleich 100 % gesetzt. Die nach 15 min bei 8000 g - Zentrifugation in Überstand verbleibende Restaktivität der Proben (n = 28) sind als Punkte in der mittleren Säule der Abb. eingezeichnet. 15 dieser Überstände wurden erneut über 15 min zentrifugiert, und zwar bei 100 000 g. Die hierbei verbleibende Restaktivität im Überstand ist durch Punkte in der rechten Säule des Diagramms dargestellt. Alle Aktivitätsangaben sind Prozentangaben bezogen auf die Aktivität der Gesamthomogenate.

Trypsin:

Auch nach Zentrifugation eines Stuhlhomogenates über 15 min mit verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen fanden wir nur Bruchteile der Gesamtaktivität im Überstand (Tab.: 2).

Tabelle 1 und 2:
Enzymkonzentration in den Überständen nach 15 min Zentrifugation bei verschiedenen Zentrifugalbeschleunigungen. Enzymkonzentrationen im Gesamthomogenat vor Zentrifugation = 100 %. Alle Messungen von Stuhlhomogenat eines Patienten.

Zentrifugalbeschleunigung in g	CT-Aktivität	T- / ml
270	56,7 %	26,7 %
3 020	14,1 %	14,1 %
10 000	5,9 %	11,1 %
100 000	1,9 %	

1.5 Haltbarkeit der Enzyme im Stuhl:

Chymotrypsin:

Homogenate von 5 Stuhlproben wurden unter Luftverschluß bei Zimmertemperatur (ca. 22 ^{o}C) über 3 Wochen gelagert. Der Abfall der nachweisbaren CT-Aktivität hat nach 6 Tagen Inkubation 8 - 34 % ($\bar{x}$ = 19,4 %) und nach 20 Tagen 3-51 % ($\bar{x}$ = 31 %) ausgemacht. (Abb. 6)

Trypsin:

Unter entsprechenden Bedingungen wurden für T nach 6 Tagen Inkubation ein Aktivitätsverlust von 0 - 69 % ($\bar{x}$ = 22 %) und nach 20 Tagen 3 - 90 % ($\bar{x}$ = 40 %) gemessen. (Abb. 7)

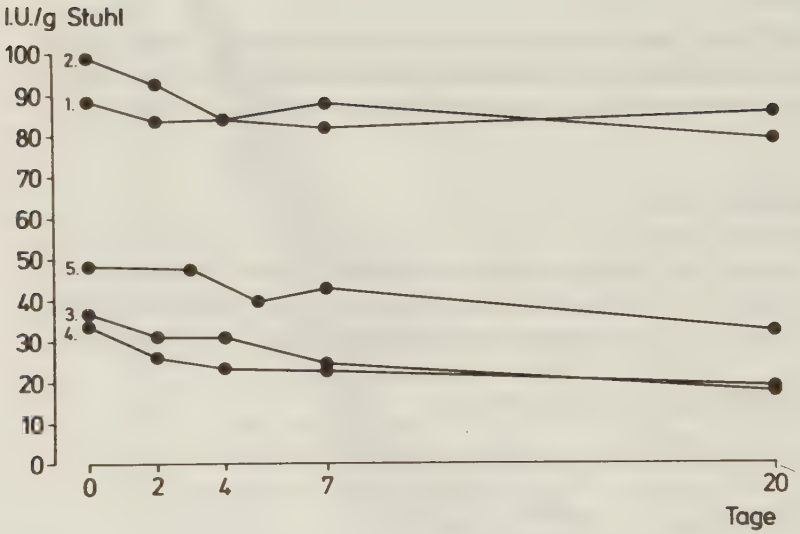


Abb. 6:

CT im Stuhl: Verlust der CT-Aktivität bei Lagerung von Stuhlhomogenat über 20 Tage bei Zimmertemperatur, 5 Proben, Einzelbestimmungen

1.6 Zuverlässigkeit der titrimetrischen Methode:

Chymotrypsin:

a) 10malige Betimmung der CT-Aktivität in einem Stuhlhomogenat ergab:
   Mittelwert: $\bar{x}$ = 99,8 % IU/g Stuhl
   Standardabweichung: s = 6,01
   Variationskoeffizient: V_k = 6,02 %

b) In 376 Stuhlhomogenaten wurde jeweils zweimal die CT-Aktivität bestimmt.

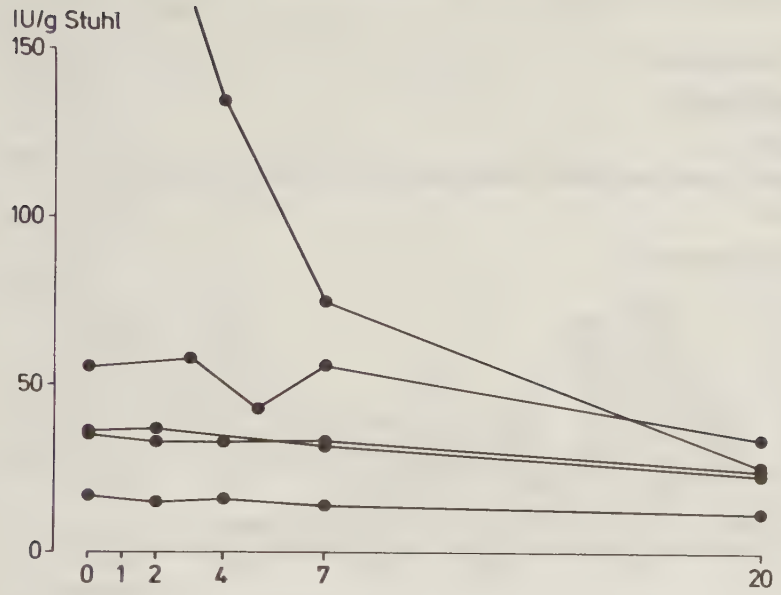


Abb. 7:
Trypsin im Stuhl: Verlust der T-Konzentration (IU/ g Stuhl) bei Lagerung von Stuhlhomogenat über 20 Tage bei Zimmertemperatur, 5 Proben, Einzelbestimmungen

Zur Berechnung des Variationskoeffizienten (V_k) benutzen wir die Formel: $s = \frac{(x'-x'')^2}{2n - 2}$

s = Standardabweichung
x' = Aktivität der 1. Bestimmung des Homogenates
x'' = Aktivität der 2. Bestimmung des Homogenates
n = Zahl der untersuchten Homogenate
Danach beträgt V_k = 6,8 % bei der Durchführung von 2fach Messungen aus einem Homogenat.

Trypsin:

Doppelbestimmungen von T in 340 Einzelproben zeigen bei der Auswertung einen V_k = 12,9 % (unter Verwendung derselb.Formel)

2. Ergebnisse der klinischen Untersuchungen:

2.1 Normalwerte:

Chymotrypsin:

Abb 8:
Chymotrypsin im Stuhl: Häufigkeitsverteilung der Normalwerte

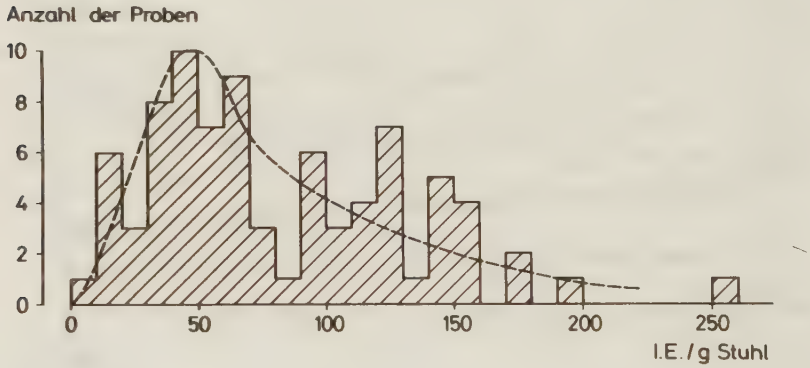


Abb. 8 zeigt in Form einer Häufigkeitsverteilung das Resultat der Untersuchung von 83 Stuhlproben der Normalgruppe. 95 % der Werte liegen höher als 15,4 IU/g Stuhl. Betrachtet man die Verteilung in grober Näherung als logarithmisch-normal, so kann man Mittelwert und Standardabweichung der Logarithmen der Einzelwerte berechnen.
Man erhält für Logarithmen:
$\bar{x} = 1.8089$ $\bar{x} - 2s = 1.1875$ $\bar{x} - 3s = 0.8692$
und nach Delogarithmieren:
$\bar{x} = 64,4$ $\bar{x} - 2s = 15,4$ $\bar{x} - 3s = 7,4$
Als normal bezeichnen wir alle Werte oberhalb der 2s-Grenze, also alle Werte über 15,4 IU/g Stuhl.

Trypsin:

Abb. 9 zeigt in Form einer Häufigkeitsverteilung das entsprechende Resultat der T-Bestimmung in 78 Stuhlproben der Normalgruppe. 95 % der Werte liegen über 1,9 IU/g Stuhl.

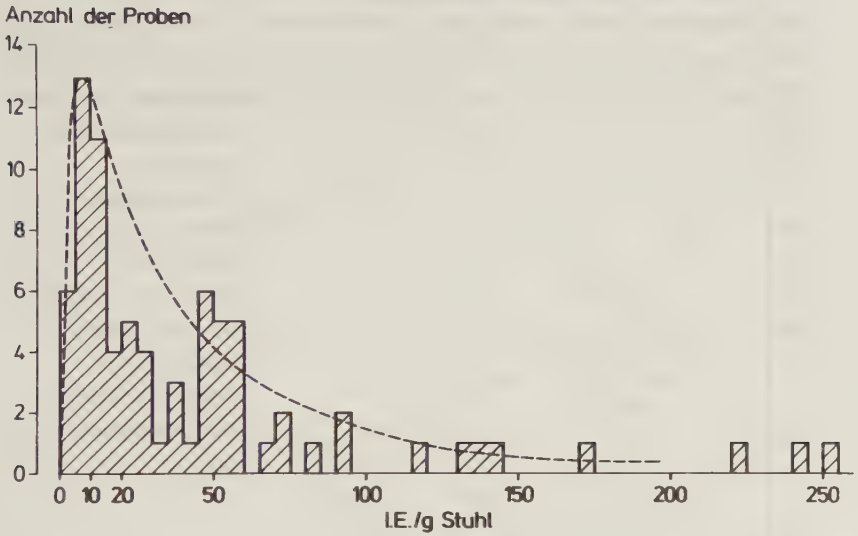


Abb. 9:
Trypsin im Stuhl: Häufigkeitsverteilung der Normalwerte

Es liegt ein angenähert logarithmischer Verteilungstyp vor. Die Näherung vernachlässigend finden wir folgende Logarithmen:

$\bar{x}$ = 1.3802 $\bar{x}$ - s = 0.8344 $\bar{x}$ - 2 s = 0.2906

und nach Delogarithmieren:

$\bar{x}$ = 24,0 $\bar{x}$ - s = 6,3 $\bar{x}$ - 2s = 1,9

Den Bereich zwischen 6,3 und 1,9 IU/g Stuhl bezeichnen wir im Folgenden als "unteren Normbereich". Als normal werden alle Werte oberhalb der 2s-Grenze, also alle Werte oberhalb von 1,9 IU/g Stuhl bezeichnet.

2.2 Altersabhängigkeit:

Chymotrypsin:

Werden die CT-Aktivitäten im Stuhlhomogenat in Abhängigkeit

vom Alter der Patienten aufgetragen, so ist eine Abnahme der Häufigkeit hoher Werte mit zunehmendem Alter zu verzeichnen (Abb. 10).

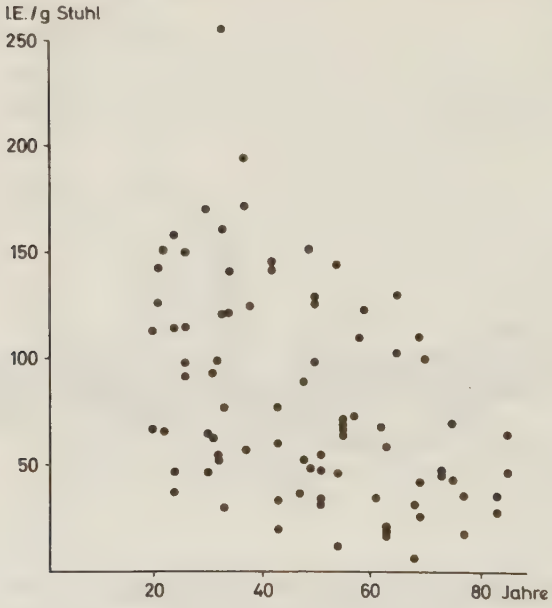


Abb. 10: Altersabhängigkeit der Chymotrypsinaktivität im Stuhl von Normalpersonen, n = 55; jeder Punkt entspricht einem Stuhlhomogenat (n = 83).

Trypsin:

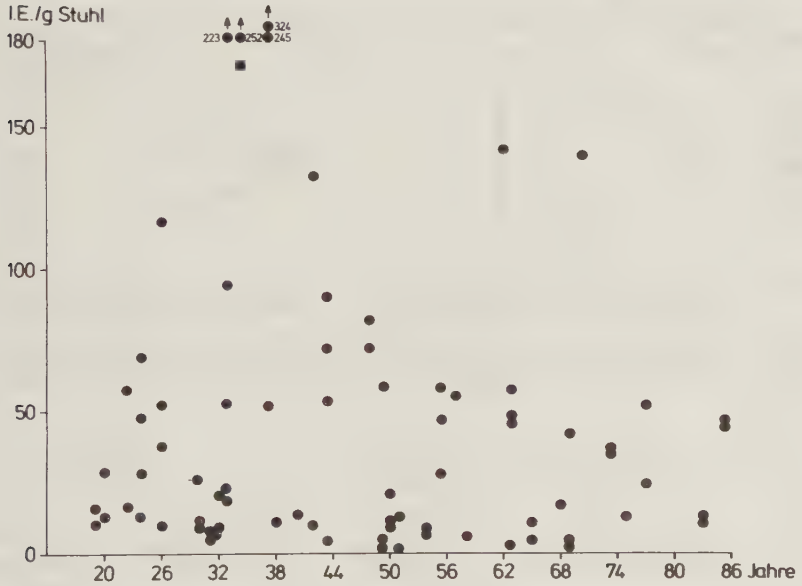
Abb. 11 zeigt die T-Aktivitäten im Stuhl in Abhängigkeit vom Alter der Patienten. Auch in diesem Kollektiv scheint sich eine jedoch weniger ausgeprägte Tendenz zu niedrigeren Werten in höherem Alter abzuzeichnen.

2.3 Einfluß einer Substitutionstherapie:

Chymotrypsin:

Abb. 12 zeigt Verlaufskontrollen bei zwei pankreatektomierten Patienten. Unter oraler Substitution mit enzymhaltigen Präparaten sind die Werte normal, während drei Tage nach Absetzen der Mediaktion tiefpathalogische Werte erhalten wurden. Nach erneuter Einnahme der Präparate stei-

Abb. 11:
Altersabhängigkeit der Trypsinaktivität im Stuhl von Normalpersonen, n=55; jedem Punkt entspricht ein Stuhlhomogenat (n = 78).

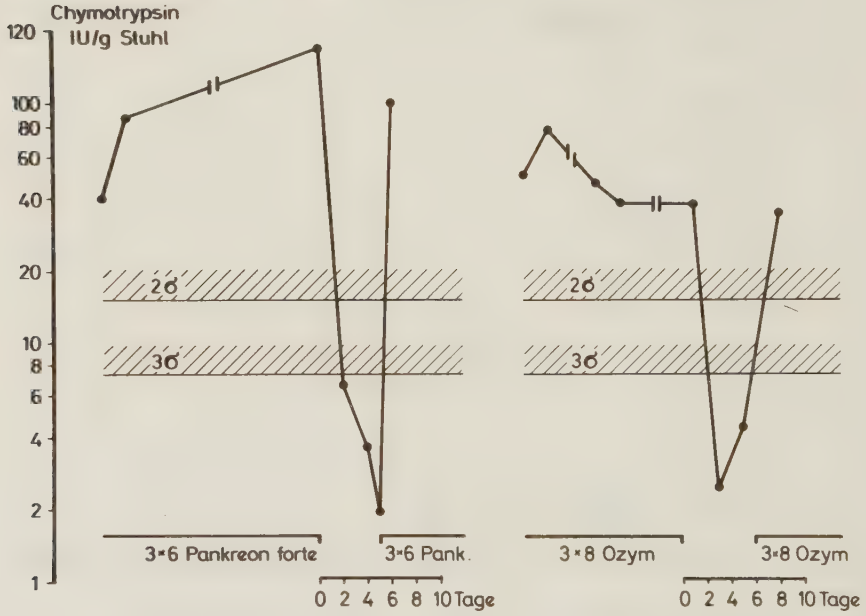


gen die Enzymwerte im Stuhl sehr rasch wieder an.

Trypsin:

Im selben Versuch wurde auch die T-Aktivität im Stuhl gemessen. Auch für T finden sich nach Absetzen der enzymhaltigen Medikamente bei Pankreatomierten starker Aktivitätsverlust bis auf Werte im unteren Normbereich bzw. im pathologischen Bereich (Abb. 13) Auch hier steigen die gemessenen Aktivitäten bei erneuter Substitution wieder an. Jedoch wird bei einem der beiden untersuchten Patienten die tiefste Enzymkonzentration für T erst zwei Tage später als für CT gemessen.

Abb. 12:
Einfluß einer Substutionstherapie mit Pankreasenzympräparaten auf die Chymotrypsinaktivität im Stuhl bei zwei Patienten mit Pankreasresektion, schraffiert sind die 2δ- u. 3δGrenzen) des Normalkoll. eingezeichnet; die Punkte entsprechen Einzelbestimmungen der CT-Aktivität im Stuhlhomogenat.



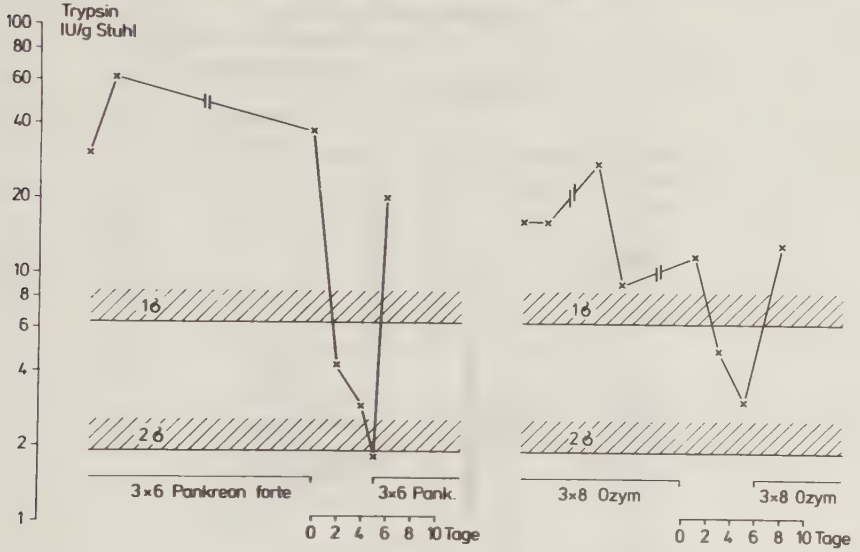
2.4 Patienten:

2.4.1 exkretorische Pankreasinsuffizienz:

Chymotrypsin:

Die Untersuchung von 32 Stuhlproben von 13 Patienten mit exkretorischer Pankreasinsuffizienz (Abb. 14) ergab nur einmal einen normalen Wert, alle anderen Werte lagen unterhalb der 2s-Grenze.

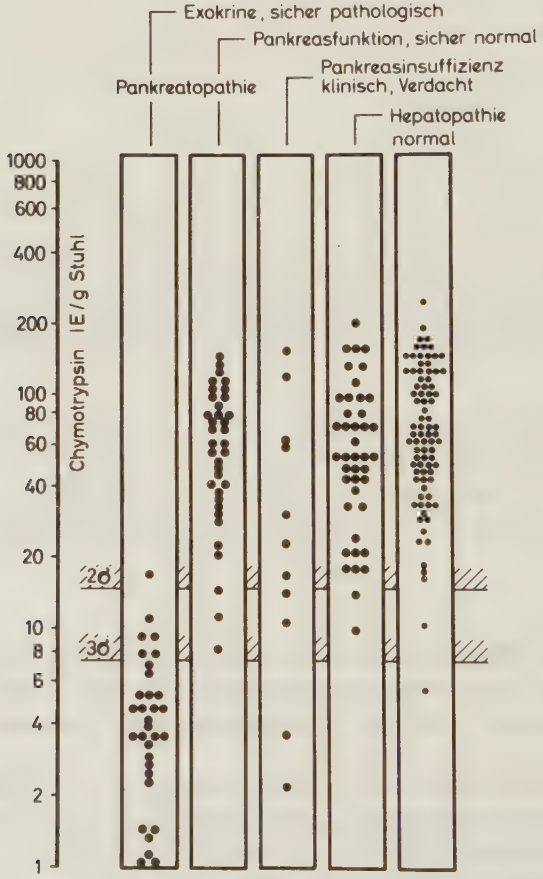
Abb. 13:
Einfluß einer Substitutionstherapie mit Pankreasenzympräparaten auf die Trypsinaktivität im Stuhl bei zwei Patienten mit Pankreasresektion, schraffiert sind die 2δ- und 3δ-Grenzen des Normalkoll. eingezeichnet; die Punkte entprechen Einzelbestimmungen der T-Aktivität im Stuhlhomogenat.



Trypsin:

In 34 Proben derselben Patienten wurden Werte für T 23mal über und nur 11mal unter der 2s-Grenze gefunden. (Abb. 16). 16 Werte liegen im unteren Normbereich, also zwischen $\bar{x}$ - 1s und $\bar{x}$ - 2s.
Bei 3 Patienten wurde nur je eine Stuhlprobe untersucht; 2 dieser Patienten boten normale, die dritte einen T-Wert im unteren Normbereich. Bei den übrigen 10 Patienten wurden 2 und mehr Proben untersucht. Tab. 3 zeigt, daß bei 5 dieser Patienten Proben im pathologischen und in weiteren Proben derselben Patienten Werte auch im unteren Normbereich gefunden wurden. Nur bei jeweils einem Patienten lagen alle

Abb. 14:
Chymotrypsinaktivität im Stuhl von Patienten mit Pankreas- u. Lebererkrankungen; das Normalkollektiv ist ganz rechts eingezeichnet, der schraffierte Bereich gibt die 2δ- und die 3δ-Grenze des Normalkollektives an.



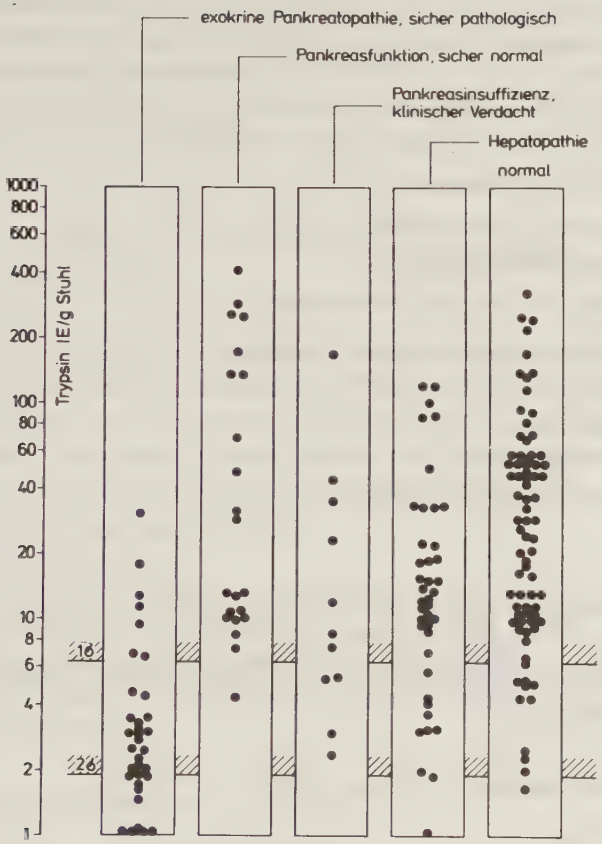


Abb. 16:
Trypsinaktivität im Stuhl von Patienten mit Pankrea - topathien und Lebererkrankungen. Das Normalkollektiv ist rechts eingezeichnet; der schraffierte Bereich gibt die 1δ- und die 2δ-Grenze des Normalkollektives an.

Tabelle 3:
"Verteilungsmuster" der Trypsinaktivität bei Untersuchung mehrer Stuhlproben pro Patient (2 bis 4 Proben pro Patient)

T R Y P S I N	Anzahl der Patienten
alle Proben im Normbereich	1
Proben teils im Normbereich und teils im "unteren Normbereich"	2
alle Proben im "unteren Normbereich"	0
Proben teils im norm., teils im pathol., teils im unteren Norm-Bereich	1
Proben teils im pathol., teils im unteren Norm-Bereich	5
alle Proben im pathol. Bereich	1
Summe:	10

untersuchten Stuhlproben im pathologischen bzw. normalen Aktivitätsbereich.

2.4.2 Pankreasfunktion sicher normal:

Chymotrypsin:

Bei 13 Patienten mit Verdacht auf Pankreaserkrankung, aber eindeutig normaler exokriner Pankreasfunktion, wurden 36 Stuhlproben untersucht. Ein Wert lag im Grenzbereich, zwei Werte waren falsch-pathologisch (Abb. 14). Die dazugehörigen drei Stuhlproben stammten von zwei Patienten. Weitere vier Stuhlproben dieser beiden Patienten hatten normale Chymotrypsin-Werte. Bei einem dieser Patienten wurde später histologisch die Diagnose einer einheimischen Sprue gestellt. Dieser Patient wurde daher auch in die unter "Sprue-Syndrom" zusammengestellte Gruppe aufgenommen.

Trypsin:

T-Bestimmungen (Abb. 16) wurden nur bei 22 Proben von 16 dieser Patienten durchgeführt. Alle Werte befanden sich oberhalb der 2s-Grenze. Ein Wert eines Patienten, von welchem nur eine Stuhlprobe untersucht wurde, liegt im unteren Normbereich.

2.4.3 Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz:

Chymotrypsin:

Nur vier von elf Stuhlproben der 6 Patienten mit Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz ergaben pathologische Chymotrypsin-Werte (Abb. 14). Nur bei einem dieser Patienten liegen zwei Werte im pathologischen Bereich, bei den übrigen fielen Wiederholungsuntersuchungen normal aus.

Trypsin:

Für T wurden keine Werte im pathologischen Bereich gefunden (Abb. 16). Vier der elf Werte liegen jedoch im unteren Normbereich. Diese Proben stammen von 3 Patienten, welche jeweils in einer zweiten Stuhlprobe T-Aktivität im Normbereich aufwiesen.

2.4.4 Erkrankungen der Gallenwege:

Chymotrypsin:

Von 18 Patienten mit Erkrankungen der Gallenwege wurden 31 Stuhlproben untersucht. 5 Werte von 4 Patienten liegen unterhalb der 2s-Grenze (Abb. 15).

Trypsin:

Von diesen 31 Proben liegen 2 Proben von 2 Patienten mit T im pathologischen Bereich (Abb. 17). 12 dieser Proben liegen im unteren Normbereich. Bei einem dieser beiden Patienten mit pathologischen T-Werten wurde eine zweite Probe

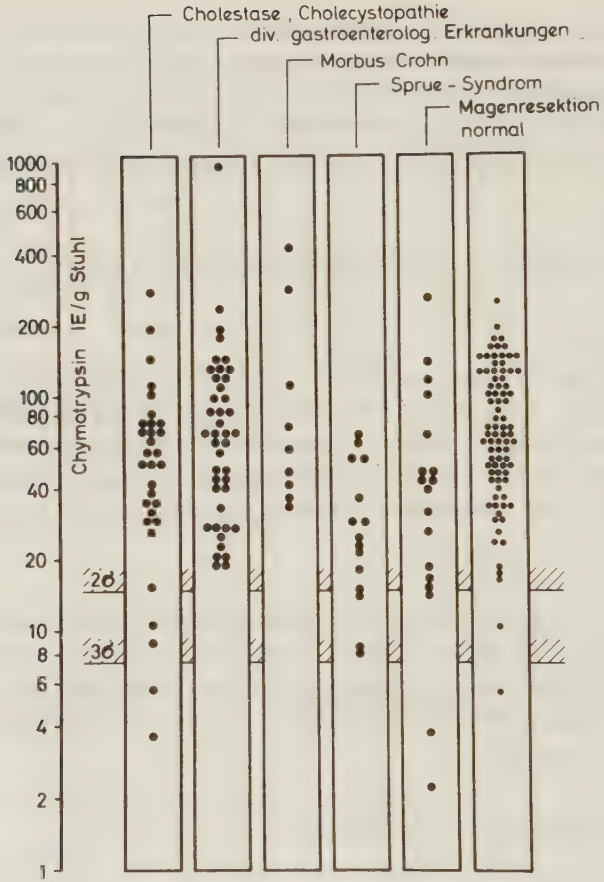
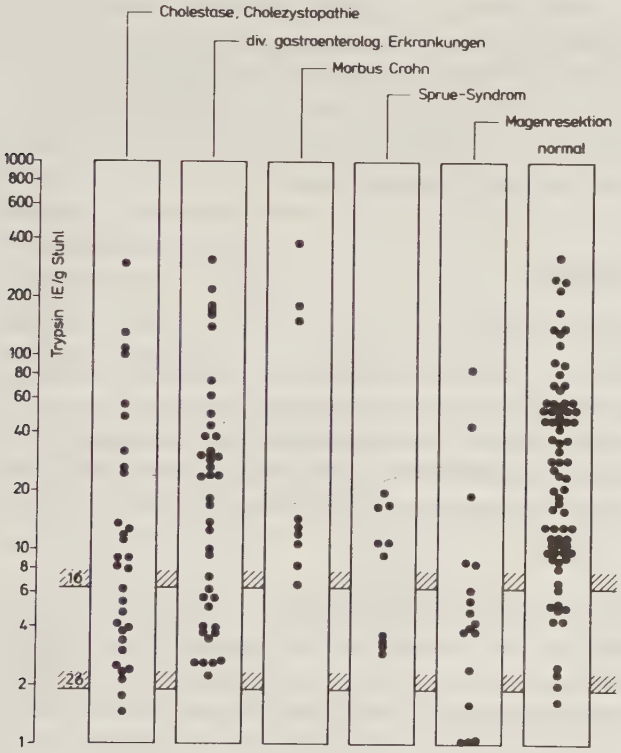


Abb. 15:
CT-Aktivität im Stuhl von Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen; das Normalkollektiv ist wie in Abb. 14 ganz rechts eingezeichnet, der schraffierte Bereich gibt die 2δ- und die 3δ- Grenze des Normalkollektives wieder.

Abb. 17:
Trypsinaktivität im Stuhl von Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen. Das Normalkollektiv ist rechts eingezeichnet; der schraffierte Bereich gibt die 1δ- und die 2δ-Grenze des Normalkollektives an.



mit der T-Aktivität im Normalen gefunden.

2.4.5 Lebererkrankungen:

Chymotrypsin:

Von 22 Patienten mit Lebererkrankungen wurden 42 Stuhlpro-

ben untersucht. Alle Werte liegen im Normbereich, mit Ausnahme zweier Proben, deren Chymotrypsin-Konzentration zwischen der 2s-Grenze und der 3s-Grenze zu finden ist (Abb. 14).

Trypsin:

T wurde in 41 Proben von 22 Patienten bestimmt. Zwei der Werte von 2 Patienten liegen im pathologischen Bereich. Bei beiden Patienten wurde die T-Aktivität einer zweiten Stuhlprobe bestimmt und im unteren Normbereich gefunden. Insgesamt 8 Proben wiesen Werte im unteren Normbereich auf (Abb. 16).

2.4.6 Sprue-Syndrom:

Chymotrypsin:

15 Stuhlproben von 7 Patienten wurden untersucht. Vier Proben liegen mit ihren CT-Werten unter der 2s-Grenze, eine davon liegt im Grenzbereich. Die dazugehörigen Stuhlproben stammten von drei Patienten. Weitere 5 Stuhlproben dieser Patienten liegen im Normbereich (Abb. 15).

Trypsin:

Von 6 dieser Patienten (bei 10 Proben) liegen 2 Patienten mit je 2 Proben mit der T-Aktivität im unteren Normbereich. Alle übrigen Proben wiesen normale Werte über der 1s-Grenze auf. (Abb. 17)

2.4.7 Magenresektion:

Chymotrypsin:

Drei der 18 Stuhlproben der 12 magenresezierten Patienten ergaben pathologische CT-Werte. Zwei dieser Proben stammen von einem Patienten mit Diabetes mellitus und patholo-

gischer Fettausscheidung im Stuhl. Eine weitergehende Klärung war nicht möglich, eine ausgeprägte Pankreasschädigung ist jedoch wahrscheinlich (Abb. 15).

Trypsin:

17 Proben derselben Patienten wiesen 4 pathologische T-Werte und 8 T-Werte im unteren Normbereich auf. Die 4 pathologischen Proben stammen von einem Patienten mit 2 Proben in diesem Bereich und 2 Patienten mit je einer pathologischen und einer im unteren Normbereich liegenden T-Ausscheidung. Der Pat. mit 2 pathologischen T-Werten ist mit dem erwähnten, vermutlich Pankreasgeschädigten identisch. (Abb.17)

2.4.8 Morbus Crohn

Chymotrypsin:

9 Stuhlproben von 6 Patienten zeigen keine pathologischen Befunde. (Abb. 15)

Trypsin:

Auch die T-Ausscheidung der 6 Patienten liegt mit 9 Stuhlproben in der Norm. (Abb. 17)

2.4.9 Verschiedene gastroenterologische Erkrankungen:

Chymotrypsin:

41 Stuhlproben von 27 Patienten wurden untersucht. Es ergaben sich keine pathologischen Werte. (Abb. 15)

Trypsin:

Bei T-Bestimmung fanden wir hingegen unter 42 Proben von 28 Patienten 13 T-Werte im unteren Normbereich.(Abb. 17)

2.4.10 Psoriasis:

Chymotrypsin:

In 15 Stuhlproben von 8 Patienten mit Psoriasis (ohne Abbildung) wurden keine pathologischen Ergebnisse gefunden.

Trypsin:

Für T fanden wir bei denselben Proben 3 Patienten mit je 2 Proben im unteren Normbereich und einen Patienten mit einem pathologischen und einem normalen T-Wert und einen Patienten mit einem Wert im Normalen und einem weiteren Wert im unteren Normbereich. (ohne Abb.)

2.5 Korrelation von CT und T im Stuhl:

In Abb. 18 sind für das Normalkollektiv und für das Kollektiv der Patienten mit sicherer Pankreasinsuffizienz die CT- und T- Aktivitäten korreliert.

a) Im Normalkollektiv findet sich keine Probe, in der die CT-Aktivität pathologisch wäre und die T-Aktivität gleichzeitig normal. In einem Fall entspricht allerdings einem pathologischen CT-Wert ein T-Wert im unteren Normbereich. Die übrigen Verhältnisse veranschaulicht Tabelle 4.

b) Im Kollektiv der Patienten mit sicherer exokriner Pankreasinsuffizienz zeigt eine Probe mit normaler CT-Aktivität gleichzeitig auch normales T. Die übrigen Werte sind summarisch aus Tabelle 5 zu entnehmen.

2.6 Untersuchung mehrerer Stuhlproben eines Patienten:

Chymotrypsin:

6 von 18 Stuhlproben mit pathologisch niedriger CT-Konzen-

Tabelle 4: Korrelation der CT- und T-Aktivität in Stuhlproben des Normalkollektives

T R Y P S I N			
	normaler	65 Proben	-
	unterer Normbereich	11 Proben	1 Probe
	pathologischer Bereich	1 Probe	-
		normaler	patholgischer Bereich

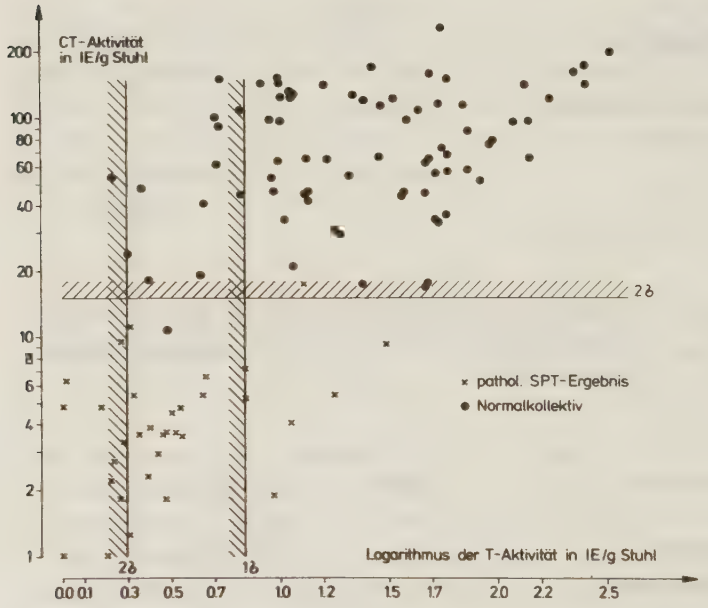
C H Y O T R Y P S I N

Tabelle 5: Korrelation der CT- und T-Aktivität in Stuhlproben der Patienten mit pathologischem Ergebnis im S-P-T

T R Y P S I N			
	normaler	1 Probe	6 Proben
	unterer Normbereich	-	16 Proben
	pathologischer Bereich	-	10 Proben
		normaler	pathologischer Bereich

C H Y M O T R Y P S I N

Abb. 18:
Korrelation zwischen den Logarithmen der CT- und T- Aktivitäten in den Stuhlproben der Normalgruppe und der Patienten mit pathologischem S-P-T-Ergebnis, die schraffierten Flächen geben die 2δ- bzw. die 1δ-Grenzen der Normalgruppe für Chymotrypsin und Trypsin wieder.



tration, die nicht zum Kollektiv der Patienten mit sicher pathologischer exokriner Pankreasfunktion gehörten, wiesen bei CT-Bestimmung in weiteren Proben normale Werte auf.

Trypsin:

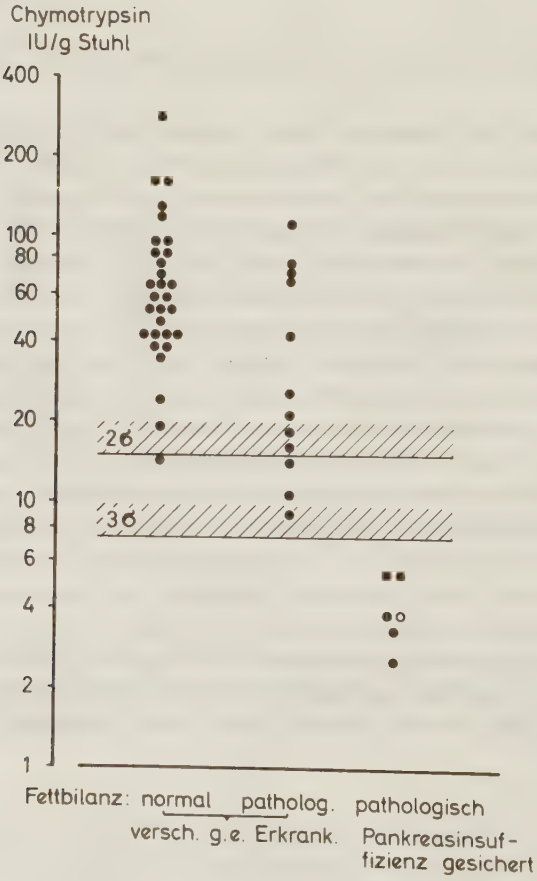
Von allen untersuchten Personen, mit Ausnahme der Patienten mit sicherer exokriner Pankreasinsuffizienz, existierten lediglich 10 Proben mit pathologischer T-Aktivität. Eine dieser Proben stammte von einem Patienten, welcher in weite-

ren Proben normale T-Werte hatte. 4 der 9 übrigen Proben waren von Patienten, die mit weiteren Proben im unteren Normbereich lagen. Von 66 Proben im unteren Normbereich fanden sich lediglich 6, die in einer weiteren normale Werte aufwiesen.
Die Ergebnisse für die Patienten mit sicherer exokriner Pankreasisuffizienz sind bereits in Tabelle 3 gezeigt worden.

2.7 Vergleich der CT- mit der Fett-Ausscheidung im Stuhl

Abb. 19 zeigt das Ergebnis eines Vergleiches zwischen der Fettausscheidung und der CT-Konzentration im Stuhl. Gruppe 1 umfaßt 30 Patienten mit normaler Fettausscheidung. Die CT-Werte dieser Patienten lagen alle im Normbereich, mit Ausnahme einer grenzwertigen Probe. Gruppe 2 umfaßt 12 Patienten mit pathologischer Fettausscheidung; die Daignosen in dieser Gruppe lauten: Sprue-Syndrom, M. Crohn, Lebercirrhose, Gastrektomie, Zustand nach Cholezystektomie. Eine exokrine Pankreasinsuffizienz konnte in keinem dieser Fälle nachgewiesen werden, in einem Fall allerdings handelte es sich um den oben erwöhnten, stark auf eine Pankreasinsuffizienz verdächtigen magenresezierten Patienten; auf ihn entfällt einer der drei pathologischen CT-Werte in dieser Gruppe. Die verbleibenden zwei "falsch-pathologischen" Werte betrafen Patienten mit Leberzirrhose bzw. Zustand nach Cholecystektomie. Gruppe 3 umfaßt Patienten mit im S-P-T gesicherter Pankreasinsuffizienz. Hier lag in allen Fällen neben der pathologischen Fettausscheidung auch eine pathologische CT-Ausscheidung im Stuhl vor.

Abb. 19:
Verhalten der Chymotrypsinaktivität im Stuhl im Vergleich zur Stuhlfettausscheidung bei Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen und 6 Patienten mit gesicherter exkretorischer Pankreasinsuffizienz.
Die schraffierten Flächen kennzeichnen die 2δ- und die 3δ-Grenze des Normalkollektives.



D. Diskussion:

1. Zur Durchführung des Testes:

Als Grundlage für das methodische Vorgehen dienten uns Angaben von Haverback (27) und Ammann (persönliche Mitteilungen).

1.1 Stuhlproben:

Von guter Korrelation zwischen Enzymkonzentrationen in Einzelstuhlproben zu denen in 24-Stunden-Sammelstühlen bei 11 von 12 Patienten berichtete Haverback (27) schon 1963. Auch Ammann (4) hielt diese Korrelation für ausreichend für einen Such-Test. Jedoch ist bei Durchfallserkrankungen mit erhöhten Stuhlmengen in der Regel die Darmpassage schneller und damit vermutlich das Ausmaß der Inaktivierung der Enzyme im Darmlumen geringer. Dies findet in der Enzymkonzentration im Stuhl wahrscheinlich jedoch keinen vollen Niederschlag, da die Stuhlmasse bei Durchfallserkrankungen gleichzeitig erhöht ist. Nach Ammann (4) bietet das Sammeln des Stuhles über 24 Stunden keine Sicherheit vor falsch-pathologischen Werten und ist damit nicht generell zu empfehlen. Haverback et al. (27) fanden entscheidende Vorteile weder beim Auswerten von Aktivitätsbestimmungen in 72-Stunden-Sammelstühlen, noch bei Berücksichtigung des Körpergewichtes.
Banwell (7) und Muller (34) geben die Aktivitäten pro 24 Std. an. Dyck (16) drückt bei Kindern Aktivität in U/kg Körpergewicht/72 Std. aus. Er sieht darin eine der Ursachen für die im Gegensatz zu Untersuchungen bei Erwachsenen bessere Trennung der von ihm untersuchten Kollektive pankreasgesunder und pankreaskranker Kinder. Er hält Sammlung des Stuhles über 72 Stunden generell für nötig. Allerdings stützt sich diese Auffassung nur auf Vermutungen, nicht auf vergleichende Untersuchungen.

Wir bearbeiten generell Einzelstuhlproben, weil wir anhand von 40 Patienten eine gute Korrelation zwischen Einzelstuhlproben und Proben aus 72-Stunden-Sammelstuhl gesehen haben (46). Auch der geringere Arbeitsaufwand, die Möglichkeit der ambulanten Diagnostik, sowie die Möglichkeit zum Postversand des Untersuchungsmaterials geben Anlaß, Einzelproben Sammelstühlen vorzuziehen.
Bei Stuhlgewichten über 300 g/24 Std. empfiehlt sich bei Proben mit Aktivitäten im pathologischen Bereich auf Sammelstuhluntersuchungen zurückzugreifen. Auch ist es naheliegend, Bestimmungen in Sammelstühlen dort durchzuführen, wo im Rahmen der Stuhlfettausscheidungsbestimmung sowieso über 3 Tage gesammelt wird. Normalwerte hierfür werden von Ammann (4) mit 7,5 mg CT/24 Std. und 4,0 mg T/24 Std. angegeben (mündliche Mitteilung). Dyck (16) gibt für Kinder (n = 33) im Alter von 3 Monaten bis 10 Jahren CT-Ausscheidungswerte im Mittel von 30.775 U pro 72 h an.

1.2 Lagerung der Stuhlproben:

Bis zur Verarbeitung lagern wir Stuhlproben im Gefrierschrank. Auch bis zum Postversand empfehlen wir die Proben zumindest im Kühlschrank aufzubewahren (s. auch unter D 2.5).

1.3 Homogenisation:

Homogenisation mit dem Ultraturrax (45, 47) bietet gegenüber den Resultaten des Homogenisators nach Potter (54) und gegenüber dem einfachen Verrühren des Stuhles mit einem Magnetrührer (31) bei sorgfältigem Arbeiten keinen prinzipiellen Vorteil (46). Jedoch ziehen wir ein elektrisches Mixgerät vor, da dieses Vorgehen für Routinezwecke im Hinblick auf Schnelligkeit und erforderlicher Aufmerksamkeit das einfachere Verfahren ist.
In einer ersten Untersuchungsreihe fanden wir maximale Aktivität nach einer Homogenisationsdauer von 4 min. Aller-

dings konnten wir später bei anderen Stuhlproben nicht mehr dieses eindeutige Maximum nach 4 min. Homogenisationsdauer zeigen. Empfehlungen zur Dauer der Homogenisation lassen sich wegen dieses unterschiedlichen Verhaltens der verschiedenen Stuhlproben nur schwierig aussprechen. Nach unserer Auffassung sollte allerdings die Homogenisationsdauer von 90 sec. nicht unterschritten werden.

1.4 Filtration:

Filtration des Homogenates durch eine doppelte Lage von Verbandsgaze haben wir von Ammann (5) übernommen. Wir erreichen dadurch eine bessere Pipetierbarkeit des Stuhlhomogenates. Die Problematik dieses Vorgehens haben wir bereits anderweitig berichtet (14).

1.5

Ungeprüft haben wir die Empfehlung von Ammann (4) übernommen, Homogenisate nach der Homogenisation bzw. der Tiefkühlung zunächst ca. 30 min. bei Zimmertemperatur stehen zu lassen. Ohne diese Vorkehrung gibt Ammann an, starke Aktivitätsschwankungen bei der Enzymbestimmung gesehen zu haben.

1.6 pH-stat-Titration:

Die pH-stat-Titration ist gegenwärtig das einzige in der Routine angewandte Verfahren für die Stuhlenzym-Diagnostik. Alternativ ist allein das von Willig und Körber (54, 36) beschriebene colorimetrische Verfahren zu nennen (44).
Die Volumenangaben zu unseren Testansätzen übernahmen wir von Ammann (mündliche Mitteilung,2). Unsere etwas geringere ATEE-Konzentration im Vergleich zu anderen Untersuchern fällt kaum ins Gewicht; es wird eine um 2-3 % geringere Aktivität gemessen.
Wir titrieren bei pH 9.0, weil wir bei diesem pH-Wert eine

maximale Enzymaktivität gemessen haben. Als Meßtemperatur haben wir, wie im deutschen Sprachraum für Enzymaktivitätsbestimmungen üblich, 25°C gewählt.

2. Untersuchungen zur methodischen Brauchbarkeit:

2.1 Ursprung des CT im Stuhl:

Pankreasenzyme sind im oberen Dünndarm einer starken Inaktivierung ausgesetzt (55, 22). Nach einer Schätzung von Ammann (4) finden sich etwa 5 %o der vom Pankreas sezermierten Enzymmenge im Stuhl wieder. Sale et al. (42) fanden nach Stimulation mit Sekretin und Pankreozymin und nach Verabreichung von Laxantien eine deutlich größere Menge an CT und T im Stuhl im Verhältnis zu dem ins Duodenum sezernierten Enzym.

Zur Frage nach dem Ursprung des fäkalen CT und T hat Grossmann (25) 1962 Untersuchungen an Hunden vorgelegt. Er führte Pankreasgangunterbindungen durch und fand danach praktisch keine Enzymaktivität mehr (Restaktivität im Stuhl: 2 % CT und 4 % T).

Auch pankreatsektomierte Patienten zeigen durchweg praktisch keine CT-Ausscheidung im Stuhl (s. C 2.3).

Pelot (39) hat den gemeinsamen Ausführungsgang für Galle und Pankreassekret bei Ratten unterbunden und nach außen abgeleitet. Zwei Stunden später fand er nur noch ca. 10 % der ursprünglichen CT-Aktivität im Darm, 16 Stunden nach der Operation nur noch etwa 1 %. Diese Befunde tsprechen für das Pankreas als Ursprung des CT im Stuhl.Unterschiede der K_m-Werte gibt es sowohl zw. Rinderpankreas-CT und menschlichem Stuhlchymotrypsin, als auch zw. Stuhlenzym von verschiedenen Patienten untereinander.

2.2 Linearität:

Einen linearen Zusammenhang zwischen Laugenverbrauch und Zeiteinheit bei der pH-stat-Titration und eingesetzter Enzymmenge (Reinenzym und Stuhlhomogenat) konnten wir bis 8 IU Enzymaktivität im Testansatz nachweisen. Einwandfrei auswertbare Registrierkurven werden aus technischen Gründen bei unserer apparativen Anordnung nur erhalten, wenn der Laugenverbrauch pro min 80 µl nicht überschreitet. Die entsprechenden Enzymaktivitäten müssen durch Verdünnung der Proben erreicht werden.

2.3 Meß-pH:

a) Schwert et al. fanden bei Verwendung von BTEE als Substrat optimale CT-Aktivität bei pH 7,8 (37, 29) und mit dem Substrat TAME optimale T-Aktivität bei pH 8.2 (48). Parks et al. (103) fanden optimale enzymat-ische Hydrolyse des Substrates ATEE bei pH 8.2.

b) 1962 wurde in Faeces von Hunden CT mit ATEE routinemässig bei pH 7.6, T bei pH 8.0 bestimmt (39, 25). Seit der klinischen Studie von Haverback (27) wurden Stuhlenzymbestimmungen dann bei pH 7,8 für CT und pH 8.2 für T mit ATEE als Substrat durchgeführt (4, 53, 6,50, 34, 7, 22,35 41). Goldberg et al. (22) zeigten optimale T-Aktivität in Material " aus menschlichem Ileum" bei pH 8.4 u. 8.1 für T aus dem Pankreas"; von derselben Gruppe konnte für CT kein reproduzierbarer Zusammenhang zwischen Enzymaktivität und pH gezeigt werden.
Wir untersuchten die Abhängigkeit der Enzymaktivität im Stuhlhomogenat vom Meß-pH und verwendeten ATEE für die CT- und TAME für die T-Bestimmung (Abb.: 1 und 2). Die Kurven verlaufen sehr flach, und es zeigten sich Schwankungen von Stuhl zu Stuhl. Jedoch ließ sich der optimale Bereich deutlich zwischen pH 8.5 und 9.5 für CT und pH 8.5 und 9.5 für T lokalisieren. Es fanden sich auch deutliche Unterschiede

zu Enzym aus Rinderpankreas und zu enzymhaltigem menschlichem Duodenalaspirat. Möglicherweise beruht diese Differenz mit auf der Partikelbindung des Enzymes im Stuhl.

2.4 Partikelbindung:

Chymotrypsin:

Uns fiel auf, daß sorgfältiges Aufschütteln der sedimentierten Anteile von Stuhlhomogenat für gute Reproduzierbarkeit der Enzymbestimmung von großer Bedeutung ist. Aus der Literatur ist das Phänomen einer CT und T-Anreicherung im sedimentierenden Anteil durchaus bekannt.
Während Pankreassekret selbst noch wasserklar ist, fanden Pelot et al. (39) in Dünndarmspülflüssigkeit aus reseziertem Rattendarm bereits Aktivitätsverluste im Überstand nach Zentrifugation (1 500 Umdrehungen / min über 10 min). Der sedimentierte Anteil betrug für CT 21 %, für T 8 % der Enzymmenge der Gesamtfraktion.
Roy et al (41) zentrifugierten Ileostomie-Material von Patienten bei 3.000 x g über 15 min. Den von ihnen angegebenen Werten kann man entnehmen, daß Überstände in gewisser Abhängigkeit von der Diät ca. 40 - 60 % der CT-Aktivität der Gesamtfraktion und ca. 55 - 75 % der T-Aktivität der Gesamtfraktion enthielten.
Im Stuhl findet Dyck (16) nach Ultrazentrifugation und Millipore-Filtration weniger als 10 % CT im Überstand bzw. Filtrat wieder. Er schließt daraus, daß der Hauptanteil des Stuhl-CT an eine großpartikuläre Fraktion gebunden ist. Dies dürfte die Ursache dafür sein, daß Borgström et al. (10) in Überständen von Stuhlhomogenaten praktisch kein Enzym nachweisen konnte.
Eigene Untersuchungen (15) zeigten, daß Stuhlhomogenat schon bei Filtration durch eine doppelte Lage von Verbandsgaze einen von Stuhl zu Stuhl verschiedenen Enzymaktivitätsverlust im Überstand der Probe bewirkt. Im Gegensatz zu Löffler et al. (31) finden wir einen deutlichen Unterschied der

CT-Aktivität in Überstand nach Zentrifugation bei 8.000 x g zu der bei 100.000 x g.

Besonders zu beachten ist die starke Streuung des prozentualem Anteiles der Restaktivität im Überstand im Verhältnis zur Gesamtaktivität. Die Aktivität von Überständen nach Zentrifugation kann daher nicht als repräsentativ für die Aktivität der Gesamthomogenate angesehen werden. Schon aus diesem Grunde muß die von Löffler (31) vorgeschlagene colorimetrisch-kinetische Bestimmung der CT-Aktivität in klaren Überständen von Stuhlsuspensionen abgelehnt werden (46).

Die Natur der enzymbindenden Partikel ist noch hypothetisch. Zur Diskussion stehen: Zellen der Ileummukosa (21, 23), Cellulose (15, 21, 47) und Bakterienbestandteile (22).

Trypsin:

Für T finden sich in der Literatur noch keine Angaben über eine Bindung an Stuhlpartikel, doch ist eine solche Bindung in Ileuminhalt beschrieben (21, 41). Aufgrund der von uns an einer Einzelprobe gezeigten geringen Restaktivität (11 %) im Überstand nach Zentrifugation mit 10.000 x g über 15 min kann man für T im Stuhlhomogenat ähnliche Verhältnisse wie für CT vermuten.

2.5 Haltbarkeit:

Während Wohlmann et al. (55) von krist. Enzym bei 37,5 ^{o}C in wässrige Lösung nach 30 min 79 % CT und 69 % T wiederfanden, konnten sie im Darmsaft nur 63 % CT und 8 % T wiederfinden. (Schon hier zeigte sich die geringere Stabilität von T gegenüber CT).
Das in Stuhlhomogenat enthaltene CT und T erwies sich hingegen in unseren Untersuchungen während Lagerung bei Zimmertemperatur als recht stabil. Dyck (16) beschreibt einen CT-Verlust von weniger als 25 % in 8 Tagen bei Zimmertemperatur.

Ammann (4) fand in Homogenaten von 4 Stühlen bei 25 °C nach 10 Tagen CT-Verluste von 8 - 24 % und T-Verluste von 5 - 58%; bei -20°C betrugen die CT-Verluste 0 - 30 % und die T-Verluste 0 - 58 % nach 10 Tagen.
Willig et al. (54), die CT und T mit Hilfe der Substrate Suphepa bzw. Bapa colorimetrisch (36) bestimmten, berichten von großen Verlusten der CT-Aktivität. So nimmt die CT-Aktivität bei 25 °C in einem Tag um ca. 50 % nach 6 Tagen um ca. 80 % ab (aus 5 Versuchen); T hat nach einem Tag ca. 20 % und nach 6 Tagen ca. 70 % verloren. Jedoch wird bei 5 °C besonders große Stabilität gefunden: während 5 Tagen sind CT und T-Aktivität "praktisch konstant", bis zum 12. Tag verliert T ca. 15 % an Aktivität.
Die Differenz der Ergebnisse von Willig et al. zu denen der übrigen Untersuchern sind wohl kaum allein auf eine besonders schnelle Aufarbeitung des Stuhles (54) nach Entleerung zurückzuführen. Sicherlich spielt auch die Tatsache eine Rolle, daß das Enzymverhalten von Stuhl zu Stuhl stark differieren kann. Um endgültige Aussagen machen zu können, müßte eine große Anzahl von Proben im Verlauf verfolgt werden.

Alle Untersucher stimmen überein, daß CT in Stuhlhomogenat stabiler als T ist. Die Ursache hierfür ist unklar.
Wir halten wie Ammann (2) Postversand von Stuhlproben für vertretbar. Nach Ammanns Befinden besteht zwar kein sicherer Unterschied zwischen der Haltbarkeit bei + 25 °C und der bei - 20 °C; trotzdem werden in unserem Labor alle Proben nach Eintreffen bis zur Aufarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

Die Ursache dieser großen Stabilität von CT und T im Stuhl ist ungeklärt. Bedenkt man jedoch, daß fast die gesammte CT- und T- Aktivität im Stuhl an Partikel gebunden vorliegt, so ist die Vermutung naheliegend, daß Beziehungen zwischen Partikelbindung und Stabilität bestehen.
Trotzdem ist Partikelbindung nicht gleichbedeutend mit Stabilisierung des Enzymes, wie Versuche mit CT-Zusatz zu Stuhlhomogenaten erkennen ließen (47). Zugesetztes CT zeigt hier-

nach sowohl im sich an Sediment anlagernden Anteil wie im freien Anteil starke von Homogenat zu Homogenat wechselnde Verluste. Bakterien tragen vermutlich nicht zur Haltbarkeit bei (10, 16, 27).

2.6 Präzision der Bestimmungsmethode:

Die klinische Aussagefähigkeit der T-Bestimmung im Stuhl ist derjenigen der CT-Bestimmung deutlich unterlegen (s. u.). Darüberhinaus ist die T-Bestimmung in Stuhlhomogenat auch methodisch unsicherer als die CT-Bestimmung. Die gezeigte Präzision der CT-Bestimmung in Stuhlhomogenat ist als befriedigend zu werten.

2.7 Enzymsubstitutionstherapie:

In der Literatur wird hingewiesen, daß eine orale Substitutionsbehandlung mit Enzympräparaten vor der Stuhlenzymausscheidungsmessung abgesetzt werden muß (4, 16, 27, 34). Nur von Haverback (27) wurden jedoch Ergebnisse von Messungen bei pankreasinsuffizienten Patienten mit und ohne Enzymsubstitution vorgelegt. Deutlich höhere CT- und T-Werte bei Patienten mit Substitutionstherapie konnte er praktisch nur an 2 von 7 Patienten zeigen. - Dieser Befund ist wohl durch relativ geringe Dosierung der verabreichten Enzyme zu erklären. - Haverback empfiehlt vor Stuhlenzymbestimmung mindestens 3 Tage die Substitutionstherapie auszusetzen.

Aufgrund unserer Erfahrungen, welche in Abb. 12 und 13 exemplarisch an 2 Patienten gezeigt sind, empfehlen wir orale Enzymsubstitution mindestens 5 Tage vor Bestimmung abzusetzen. CT- und T-Konzentrationen fallen u. U. nur langsam über Tage auf pathologische Werte ab. Bei schweren Insuffizienzen genügt es jedoch vollkommen, die Substitution nur solange auszusetzen, bis es oft schon nach 1 - 2 Tagen zu massigen Stuhlentleerungen kommt.

3. Klinische Anwendung:

3.1 Normalwerte:

3.1.1 Altersabhängigkeit:

Die Tendenz zu niedrigen Stuhlenzymkonzentrationen mit steigendem Lebensalter stellt sich für CT in stärkerer Weise dar als für T, wobei in dieser Untersuchung Personen zwischen 20 und 85 Jahren zusammengestellt sind.

Dyck (16) fand bei 33 Kindern im Alter von 1 Monat bis zu 10 Jahren unter abgeänderten Testbedingungen CT-Werte im Mittel von 202 U/g (27 - 750 U/g) und T-Werte im Mittel von 154,7 U/g (18,7 - 940 U/g), also deutlich höhere als die unseres Kollektives. (CT: $\bar{x}$ = 82,0 IU/g; $\bar{x}$ aus log berechnet = 63,4 IU/g, T: $\bar{x}$ = 48 IU/g).

Haverback (27) fand bei 6 Frühgeborenen CT-Werte im Mittel von $\bar{x}$ = 470 µg/g, T-Werte im Mittel $\bar{x}$ = 295 ug/g. Bei 13 Kindern lag CT im Mittel bei 895 µg/g und T bei 295 µg/g. Erwachsene zeigten auch hier niedrigere Werte als Kinder: CT 340 µg/g und T 104 µg/g.

Mullinger et al. (35) verfolgten Stuhlenzymwerte von Neugeborenen bis zum 7. Lebenstag. An den ersten beiden Lebenstagen waren die Werte noch niedrig. Ab dem 3. Tag fand er dann für CT im Mittel Werte von ca. 500 µg/g und für T ca. 300 µg/g, wobei der Mittelwert der T-Konzentration bis zum 7. Tag noch um ca. 130 auf 434 µg/g anstieg. Etwas niedrigere Werte bei Neugeborenen wurden von Barbero et al. (8) berichtet (4. Tag: CT: $\bar{x}$ 230 µg/g; T: $\bar{x}$ = 159 µg/g). In einer ersten großen Näherung kann man nach diesen Ergebnissen also von einer in den ersten Lebenstagen ansteigenden Stuhlenzymkonzentration ausgehen. Bei Säuglingen liegen die Konzentrationen bereits höher und erreichen dann im Kindesalter ihr Maximum. Welche Anteile die einzelnen Faktoren wie Diät, Darmpassagezeit, Muster der Darmflora etc. am Zu-

standekommen dieser Tendenz haben, ist noch nicht geklärt.

3.1.2 Verteilungstyp der Enzymkonzentration im Normalkollektiv:

In der Literatur wird von verschiedenen Arbeitsgruppen übereinstimmend ein log-Verteilungstyp der Pankreasenzymausscheidung in das Duodenum angenommen (4, 12, 20, 43, 56). Hier fügen sich unsere Ergebnisse, die einen angenähert log-Verteilungstyp der Enzyme im Stuhl bei Pankreasgesunden zeigen gut ein.

Darüber hinaus sind die von uns gefundenen, schiefen Verteilungskurven der numerischen Werte den Kurven von Smith (50) und Ammann (4) sowohl für CT wie für T deutlich ähnlich.

3.1.3 Vorgehen bei der Definition der Normgrenzen:

Haverback verwandte zur Definition der unteren Normgrenzen für CT und T im Stuhl jeweils die niedrigsten im Normalkollektiv (23 Personen, 24 Proben) gefundenen Werte. Smith (50) benutzte die untere 5 % Grenze des Normalkollektives von 110 Personen als untere Normgrenze. Andere Untersucher orientierten sich an den Werten Haverbacks oder übernahmen sie (31, 53). Auch Ammann (4) verwendet die untere Normgrenze von Haverback, definiert aber darüberhinaus auf empirischem Wege einen "unteren Normbereich", um so leichtere Insuffizienzen besser erfassen zu können.

Wir wählten als untere Normgrenze die 2$-Grenze der Logarithmen der CT- bzw. T-Werte. Darüber hinaus sprechen wir bei der T-Bestimmung wie Ammann (4) von einem "unteren Normbereich". Diesen Bereich definieren wir als zwischen der $\bar{x}$ - 1s- und der $\bar{x}$ - 2s-Grenze der Logarithmen der Werte des Normalkollektives liegend.

3.1.4 Einheit der Enzymaktivität:

Aufgrund der Empfehlung der International Union of Biochemistry geben wir die Enzymaktivitäten in Internationalen Einheiten (IU) an. Unter unseren Bedingungen entspricht 1 µg kristallisiertes CT aus Rinderpankreas (Fa. Roth) 0,182 IU und 1 µg krist. T aus Rinderpankreas derselben Firma 0,358 IU.

Smith (50) gibt unter etwas anderen Bedingungen (CT: T=27°C, pH 7.8, ATEE: 0,36 M (hier ist wohl 0,036 M gemeint), T: pH 8.2) für Rinderchymotrypsin(Worthington Biochemical coop.) 0,182 U/µg an, für Rinder-T jedoch 0,209 U/µg, also rund 40 % weniger als wir in Rinderpankreas-Trypsin fanden.

3.1.5 Vergleichbarkeit der Normalkollektive verschiedener Untersucher:

Sofern die Ergebnisse der Enzymbestimmung als "Internationale Einheiten" angegeben werden, sind die Normalwerte der verschiedenen Arbeitsgruppen nicht vergleichbar, da die Inkubationsbedingungen nicht einheitlich gewählt wurden. Es liegen Unterschiede in Meß-pH und Meß-Temperatur (7, 16,34, 50) vor; die Substraktkonzentrationen werden zwar in der Substratlösung in der Regel gleich angegeben, im Testansatz selbst liegen aber durch unterschiedliche Verdünnungen verschiedene Konzentrationen vor (4, 16, 27, 50). Substratkonzentrationen auf den Testansatz bezogen, werden zwischen 0,0129 und 0,018 M angegeben. Dies wird dadurch problematisch, daß mit 0,01 M ATEE-Lösung ein ca. 30 % geringerer NaOH-Verbrauch registriert wird als mit 0,02 M ATEE-Lösung (unveröffentlichte eigene Ergebnisse); d. h., es wird nicht in Substratsättigung gearbeitet.
ATEE-Lösung wird von Dyck (16) ohne das aktivitätshemmende Methanol angesetzt, da die Löslichkeit von ATEE aufgrund längerer Rührzeiten auch in wässriger Lösung gut gefunden wurde.

Diese methodischen Unterschiede können dadurch kompensiert

werden, daß die Methoden an Aktivitätsmessungen mit reinem Rinderenzym geeicht werden. Die Ergebnisse werden dann als ug Enzym pro g Stuhl angegeben und die Normalwerte der verschiedenen Autoren liegen - wie an Tab.6a ersichtlich - fast alle in der gleichen Größenordnung. Diese Eichung ist selbst problematisch (unterschiedliche Eigenschaften der als Referenz benutzten Chargen von Rinder-Enzym können nicht ausgeschlossen werden). Im Einklang mit den Empfehlungen der IUB ziehen wir die Angabe der Ergebnisse als IU/g Stuhl vor. Nur von Ammann (4, 5) und Dyck (17) wird ausdrücklich eine Filtration des homogenisierten Stuhles erwähnt. Diese Filtration durch eine doppelte Lage von Verbandsgaze führten wir durch, um bessere Pipetierbarkeit des Homogenates zu erreichen. Jedoch zeigen neuere Untersuchungen (15), daß diese Filtration mit einem von Homogenat zu Homogenat verschieden großem Enzymverlust verbunden ist. Ob dieses von Ammann und Dyck (5) eingeführte Vorgehen auch von anderen Untersuchern praktiziert wird, ist nicht bekannt. Dyck macht in einer späteren Arbeit (16) auch keine Angabe mehr über eine solche Filtration.

Trypsin:

Für T im Stuhl ergeben sich dieselben Probleme der Vergleichbarkeit der Grenz- und Mittelwerte der Normalkollektive verschiedener Untersucher (Tab.6b). Auch hier liegen unsere Ergebnisse nach Umrechnung in µg/g Stuhl im vergleichbaren Bereich zumindest der Werte von Ammann (4) und Haverback (27). Smith (50) gibt fast 3fach höhere Konzentrationen von T an, noch höhere sind die Werte von Banwell (7). Dyck (16) findet bei gesunden Kindern wiederum 3fach höhere Werte als wir für Erwachsene zeigen könnten.

Neben Meß-pH-Differenzen und verschiedenen Meß-Temperaturangaben machen auch für die T-Bestimmung Eichungen mit käuflichem Rinderenzym verschiedener Firmen und verschiedene Substratkonzentrationen im Testansatz (4, 27, 50), wiederum bei identischen Konzentrationen der Ausgangssubstratlösungen,

Tabelle 6a: C H Y M O T R Y P S I N (CT)- Ausscheidung - Normalwerte der Literatur

A u t o r e n	Zahl der Probanten	Zahl der Stuhlproben	Streubereich der Werte	untere Grenze der Norm	Einheit
Haverback et al. 1963 (27)	25	25	74 - 1.200 $\bar{x}$ = 340	74	µg/g Stuhl
Banwell et al. 1965 (7)	49	?	$\bar{x}$ 20,8 ± 0,75 $\bar{x}$350 ± 50	- -	mg/Tag µg CT/g Stuhl
Wilding et al. 1965 (53)	4	4	61 - 229	-	µg CT/g Stuhl
Dyck 1967 (16)	33 Kinder 3 Monate - 10 Jahre)	?	27 - 750, $\bar{x}$=202 640-4900, $\bar{x}$=2067	-	U/g Stuhl U/kg Körpergew./72 h
Ammann et al. 1968 (4)	100	?	39 - 1265 $\bar{x}$ = 290	120	µg CT/g Stuhl
Muller et al. 1970 (34)	21	21	167 - 607 $\bar{x}$ = 317	-	U/kg Körpergewicht/24 h
Smith et al. 1971 (50)	110	180	48 - 2120 $\bar{x}$ = 450	100	µg/CT/g Stuhl
Moeller et al. 1973 (32)	14	32	6,9 - 397,8	5,6	IU/g Stuhl
eigene Ergebnisse	56	83	5,5-244,6 $\bar{x}$ = 82,0	15,4	IU/g Stuhl
			30,2 - 1379 $\bar{x}$ = 450	84,6	µg/g Stuhl

Tabelle 6 b: T R Y P S I N (T) - Ausscheidung - Normalwerte der Literatur

A u t o r e n	Zahl der Probanten	Streubereich der T-Werte	untere Grenze der Norm fürT	Einheit
Haverback et al 1963 (27)	25	10 - 815 $\bar{x}$ = 104	20	µg/g Stuhl
Wilding et al. 1965 (53)	4	18 - 87		µg T/g Stuhl
Dyck 1967 (16)	33 Kinder (3 Monate - 10 Jahre)	18,7 - 940 $\bar{x}$ = 154,7 119 - 7203 $\bar{x}$ = 1911		U/g Stuhl U/kg Körpergew./72 h
Ammann et al.	100	6 - 850 $\bar{x}$ = 124	30(20)	µg T/ g Stuhl
Smith et al. 1971 (50)	110	10 - 3440 $\bar{x}$ = 285		µg T/ g Stuhl
eigene Ergebnisse	55	1,67 - 324 $\bar{x}$ = 47,5	1,9	IU/ g Stuhl
		4,65 - 904 $\bar{x}$ = 132,5		µg/g Stuhl

einenVergleich problematisch. Auch die T-Bestimmung mit TAME wird nicht in Substratsättigung durchgeführt, wie eigene Untersuchungen gezeigt haben.

3.1.6 Definition: "falsch - normal" und "falsch - pathologisch":

Das Ergebnis der Bestimmung von CT im Stuhl wird von uns dann als "falsch-normal" bezeichnet, wenn die CT-Konzentration über 15,4 IU/g Stuhl gefunden wird bei Patienten mit eindeutig pathologischem Befund im S-P-T. "Falsch-pathologisch" dagegen fällt der Test aus, wenn die CT-Konzentration unter 15,4 IU/g liegt bei Patienten mit eindeutig normalem Befund im S-P-T. Konnte ein S-P-T nicht durchgeführt werden, so bezeichnen wir Werte unter 15,4 IU/g darüber hinaus auch dann als "falsch-pathologisch", wenn der übrige Befund keinen begründeten Verdacht auf eine exokrine Pankreas insuffizienz aufkommen ließ. Zum Vergleich sind die in der Literatur aufgeführten Normalwerte in Tab. 6 aufgeführt.

Trypsin:

Das Ergebnis der T-Konzentrationen im Stuhl wird dann als "falsch-normal" bezeichnet, wenn Patienten mit eindeutig pathologischem Ergebnis im S-P-T Werte über 1,9 IU/g Stuhl aufweisen. Im Gegensatz zu Ammann zählen wir unseren "unteren Normbereich" nicht mit zum pathologischen Bereich. "Falsch-pathologisch" nennen wir das Ergebnis dann, wenn Patienten mit eindeutig normalem S-P-T bzw. ohne begründeten Verdacht auf eine Schädigung des exokronen Pankreas Werte unter 1,9 IU/g aufweisen.

3.2 Treffsicherheit der Stuhlenzymbestimmungsmethode:

3.2.1 Überblick über die Treffsicherheit der Methode in der vorliegenden Untersuchung:

Chymotrypsin:

Wendet man die im vorigen Abschnitt angegebenen Kriterien an, so ergibt sich für die Treffsicherheit der CT-Bestimmung im Stuhl ein Überblick wie in Tab. 7 dargestellt (die Gruppen "Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz" und "Psoriasis" sind in dieser Zusammenstellung nicht enthalten). Bekanntlich wird jedoch im S-P-T gelegentlich auch dann eine Einschränkung der exokrinen Funktion gefunden, wenn sich klinisch sonst kein Hinweis darauf findet, zum Beispiel bei Lebererkrankungen (20). Somit ist damit zu rechnen, daß das Risiko "falsch-pathologischer" Ergebnisses von uns eher über-, das Risiko "falsch-normaler" Werte eher unterschätzt wird. Auf die darüberhinausgehenden Probleme des S-P-T als Maßstab für eine gestörte exokrine Pankreasfunktion wurde bereits hingewiesen (S. 1).

Trypsin:

Tab. 8 gibt eine summarische Übersicht zur Treffsicherheit der T-Bestimmung im Stuhl. Auch in dieser Tabelle sind die Gruppen "Verdacht auf exokrine Pankreasinsuffizienz" und "Psoriasis" nicht enhalten.

3.2.2 Stuhl-CT bei Pankreaserkrankungen:

Haverback (27) fand bei 16 Patienten mit chronischer alkoholischer Pankreatitis keinen falsch-normalen Stuhl-CT-Wert. Muller (34) gibt für ein Kollektiv von 11 Patienten mit durch Sekretin-Test gesicherter exokriner Pankreasinsuffizienz bei chronischer Pankreatitis keine Überschneidung mit seinem Normalkollektiv an. Smith (50), der durch Festlegung der unteren Normgrenze 5 % falsch-pathologische Werte in Normalkollektiv aufweist, zeigt bei 5 Patienten mit chronischer Pankreatitis ebenfalls kein falsch-normales Ergebnis. Moeller (32) hat unter 9 Patienten mit teilweise durch S-P-T gesicherter chronischer Pankreasinsuffizienz ebenfalls keine falsch-normalen CT-Konzentrationen gemessen.

Tabelle 7: Treffsicherheit der Chymotrypsinbestimmung im Stuhl

falsch-pathologische Ergebnisse	falsch-normale Ergebnisse
15 von 224 Einzelstuhlproben waren falsch-pathologisch	1 von 32 Einzelstuhlproben war falsch-normal
12 von 117 Patienten hatten mindestens einen falsch-pathologischen CT-Wert	1 von 13 Patienten hatte einen falsch-normalen CT-Wert

Tabelle 8: Treffsicherheit der Trypsinbestimmung im Stuhl

falsch-pathologische Ergebnisse	falsch-normale Ergebnisse
8 von 206 Einzelstuhlproben waren falsch-pathologisch	23 von 34 Einzelstuhlproben waren falsch-normal
46 Proben lagen im unteren Normbereich zwischen x - s und x - 2s.	16 von diesen Proben lagen im unteren Normbereich zwischen x - s und x - 2s.
7 von 108 Patienten hatten mindestens einen falsch-pathologischen T-Wert.	12 von 13 Patienten hatten mindestens einen falsch-normalen T-Wert.

Zu diesen Arbeiten im Gegensatz steht eine Studie von Banwell (7). 1965 berichtet er von einer Gruppe von 10 Afrikanern mit calzifizierender Pankreatitis; alle hatten einen Diabetes mellitus, Steatorrhoe, und 8/10 weisen ein pathologisches Ergebnis im S-P-T auf. Mehr als 50 % der Kontrollpersonen liegen mit der CT-Ausscheidung im Bereich der Ergebnisse der Pat. mit Pankreasinsuffizienz. Allerdings werden unter den Bedingungen dieser Studie (u. a.: Titration von Hand) sehr hohe absolute CT-Werte für die Pankreasinsuffizienten gefunden (34-255 µg/g). Ammann (4) bezeichnet die 24-CT-Ausscheidungswerte als normal, wenn sie über 7,5 mg liegen. Banwell (7) findet bei Pankreasinsuffizienten 16,3 $\pm$ 2,78 mg, bei Normalpersonen 20,8 $\pm$ 0,75 mg. Ob methodische oder z. B. diätetische Fragen das Herausfallen der Ergebnisse Banwells bewirken, bleibt offen. Er erwähnt als Besonderheit die in erster Linie pflanzliche Ernährung der untersuchten Patienten. U. U. kommt hier der große Zellulosegehalt des Stuhles als Ursache der höheren CT-Ausscheidungswerte in Betracht (15, 47).
In einer späteren Arbeit berichtet Banwell unter Mitarbeit von Wilding (53) von 14 Patienten mit "Erkrankungen des Pankreas". 12 von 19 Proben weisen normale CT-Aktivitäten auf. Jedoch ist Pankreaserkrankung nicht mit exokriner Insuffizienz identisch. Nur in einem Fall der Arbeit wird ausdrücklich von einem pathologischen Ausfall des S-P-T berichtet (Vol. u. Bicarb.) bei gleichzeitig normalem Stuhl-CT-Wert. Somit ist die hohe Zahl von falsch-normalen Ergebnissen mit Vorsicht zu werten.
Während in der Arbeit von 1965 (7) Kontrollpersonen T-Werte von 4540 $\pm$ 64 µg/g hatten, haben 4 Kontrollpersonen dieser Arbeit (53) nur 18 - 87 µg/g. CT-Werte 1965: 350 $\pm$ 50 µg/g, in der späteren Arbeit: 61 - 229 µg/g. In der späteren Studie werden Normalwerte von Haverback benutzt.

In der Studie von 1967 berichtet Ammann (4) über 40 Patienten mit durch S-P-T gesicherter eindeutiger ex. Pankreasinsuffizienz. Neu ist in der Darstellung, daß bei einem durch-

schnittlich in 87,5 % pathologischem Ausfall des Stuhl-CT-Wertes bei Patienten mit Insuffizienz die Rate der falsch-normalen Ergebnisse von der Schwere der Insuffizienz abhängig ist. Falsch-normale Werte finden sich von 20 % bei leichten Insuffizienzen bis zu praktisch 0 % bei schweren Insuffizienzen.

Mit 13 Patienten und 32 Proben ist unser Kollektiv von Patienten mit gesicherter Pankreasinsuffizienz klein. Unsere Ergebnisse zeigen mit nur 3 % falsch-normalen CT-Werten ein sehr positives Bild des Testes. Es ist möglich, daß die von uns untersuchten Patienten in erster Linie solche mit schweren Insuffizienzen waren.

Dürr (13) hat 1974 in unserem Labor eine Blind-Studie anhand von 79 ausgewählten Patienten angeschlossen. Alle wurden parallel mit dem S-P-T untersucht. 33 % (9/30) der Proben der Patienten, die mit allen Enzymen beim S-P-T im pathologischen Bereich lagen hatten Stuhl-CT-Werte im Normbereich. 6/8 Patienten hatten pathologische T-Ausscheidung im S-P-T, aber normale CT-Ausscheidung im Stuhl. Außerdem berichtet er von 10 % (9/96) falsch-pathologischen Ergebnissen.

Letzte Mitteilungen (1975) aus dem Züricher Labor (persönliche Mitteilung) bringen Ergebnisse, die in Tab. 9 für 97 Patienten mit sicherer Pankreasinsuffizienz dargestellt sind. Die Diskrepanz der Ergebnisse der beiden letztgenannten Untersuchungen bleibt zunächst bestehen. Sollte sich jedoch auch in weiteren Untersuchungen die von Dürr (13) berichtete hohe Zahl von falsch-normalen Ergebnissen bestätigen, so wird der Test seinen Platz in der Klinik kaum finden können.

Pankreasektomie:

Insgesamt wird in der Literatur von 4 pankreasektomierten Patienten berichtet (27, 45, 50). Alle Ausscheidungswerte

Tabelle 9:

Prozentsatz falsch-normaler CT-Werte in Abhängigkeit von der Schwere der exokrinen Pankreasinsuffizienz. (Patienten: n = 97, nach mündlicher Mitteilung von Ammann, 1975).

Schwere der Insuffizienz	% der falsch-normalen Werte	falsch-normale Werte / Anzahl der Untersuch.
schwere Insuffizienz		
Enzymmenge und max. HCO_3^--Konz. $< \bar{x} - 3s$	4 %	2 / 46
mittelschwere Insuffizienz		
Enzymmenge und max. HCO_3^--Konz. $< \bar{x} - 2s$	11 %	3 / 27
leichte Insuffizienz		
Enzymmenge und $< \bar{x} - 2s$, max. HCO_3^--Konz. $> \bar{x} - 2s$	25 %	6 / 24

lagen nach ausreichend langem Aussetzen der Enzymsubstitution im tiefphatologischen Bereich.

Pankreas-Karzinom:

Da die Stuhlenzymbestimmung nur eine exokrine Insuffizienz anzeigen kann ist es nicht verwunderlich, daß Smith (50) bei 9 Patienten mit Pankreas-Karzinom nur 5 Patienten mit pathologischer CT-Ausscheidung findet, Ammann (4) schreibt, daß unter 14 Patienten 11 mit pathologischer CT-Ausscheidung waren.
Außerdem kann es auch als Folge fortgeschrittener Kachexie zu niedrigen CT-Ausscheidungswerten kommen (4).

Akute Pankreatitis:

Patienten mit akuter Pankreatitis wurden von uns in das Kollektiv der Patienten mit verschiedenen gastroenterologischen Erkrankungen eingereiht. Untersucht wurden in der Regel Proben der ersten beiden Entleerungen nach Auftreten des akuten Schubes. Pathologische CT-Werte fanden sich in keinem der von uns untersuchten Stuhlproben, obwohl eine verminderte CT-Konzentration im Stuhl z. B. aufgrund eines Ausführungsgangödemes denkbar gewesen wäre.

3.2.3 Stuhl-CT bei weiteren Erkrankungen des Verdauungstraktes:

Die vermehrten pathologischen Ergebnisse bei Patienten mit Verschlußikterus (4 Werte von 3 Patienten) und Zustand nach Cholecystektomie mit Diabetes mellitus (1 Wert, 1 Patient) sind unter Umständen aufgrund der Anatomie der ableitenden Gallenwerte und des Pankreasausführungsganges zu verstehen. Eine exakte Lokalisation der Verschlüsse wurde von uns nicht durchgeführt.

Es soll hier jedoch erwähnt werden, daß Ammann (4) bei 6 Patienten mit Gallengangs-Ca 3 Patienten pathologische Stuhl-CT-Ausscheidung bei normalem S-P-T zeigten. 3 von 7

Patienten mit Verschlußikterus wiesen bei normalem Ergebnis im S-P-T pathologische Stuhl-CT-Ausscheidung auf. 8/53 Patienten mit Zustand nach Cholecystektomie hatten ebenfalls pathologisch niedrige CT-Werte im Stuhl. Ammann spricht sogar von generell pathologischem Ausfall der CT-Bestimmung bei totalem Verschluß (4), ohne dafür bisher eine Erklärung geben zu können. Beim Auftreten niedriger CT-Konzentrationen im Stuhl muß somit auch auf Gallenwegserkrankungen geachtet werden.

Magenresektion nach B^{II}:

Unser kleines Kollektiv von 5 Patienten mit Zustand nach B^{II} wies nur einen Patienten auf mit zwei pathologischen CT-Werten auf; obwohl aufgrund der Ausschaltung des Duodenum aus dem direkten Passageweg durchaus eine verminderte Pankreasstimulation und Enzymsekretion verständlich gewesen wäre. So berichtet Ammann (4), daß 11 der 23 der von ihm untersuchten Patienten niedrige CT-Werte in Einzelstuhlproben hatten, aber, soweit untersucht, in 24-Std.-Stuhlausscheidungen normale Konzentrationen zeigten. Smith (50) fand bei 8 von 32 "gastrektomierten" Patienten erniedrigte CT-Werte. Auch gastrektomierte Patienten (vor allem nach B^{II}) erfordern also bei pathologischen CT-Konzentrationen im Stuhl u. U. Untersuchung einer größeren Anzahl von Einzelstuhlproben bzw. Sammelstuhluntersuchung.

Lebererkrankungen:

Die 42 Proben der Patienten mit Hepatopathie verschiedener, auch alkoholischer Genese (8 Patienten) weisen nur 2 pathologische CT-Werte auf (keine Abklärung durch S-P-T), die von 2 Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose stammten. Ein weiterer Wert des einen Patienten lag jedoch gerade im Normbereich.

Ammann (4) hat 69 Patienten mit Lebererkrankungen untersucht und immerhin 13 pathologische CT-Konzentrationen gefunden.

4 (von 15) entfielen auf Patienten mit alkoholischer Leberzirrhose. Moeller (33) findet bei 34 Patienten mit alkoholischer Leberschädigung einen mit niedrigem fäkalem CT und einen Zirrhotiker mit pathologischem Ergebnis im S-P-T, jedoch normalem CT im Stuhl.

Unter 7/21 Patienten mit alkoholischer Leberschädigung und pathologischen CT-Werten im Stuhl fand Smith (50) 5 Patienten mit Steatorrhoe.

Trotz einiger pathologischer CT-Werte im Stuhl wird in diesen Untersuchungen die angeblich hohe Zahl der Pankreasbeteiligung bei alkoholischer Leberschädigung (52, 58) nicht bestätigt. Doch wird man gerade durch die Stuhl-CT-Bestimmung in Zukunft noch weitergehenden Aufschluß über Pankreasbeteiligung bei Lebererkrankung erwarten dürfen.

3.2.4 Wert der Trypsin-Bestimmung:

Die von uns erneut gezeigte deutliche Unterlegenheit der T-Bestimmung im Stuhl als Suchtest für eine exokrine Pankreasinsuffizienz gegenüber der von CT ist von Anfang an bekannt (4, 17, 18, 27). Die Ursache hierfür bleibt aber nach wie vor unklar. Eine ganze Reihe von Untersuchern haben T-Bestimmung bereits aufgegeben (13, 31, 32, 34).

Smith (50) gibt eine die T-Konzentration um über 80 % übertreffende CT-Konzentration im Stuhl an.
Auch nach unseren eigenen Erfahrungen liegen die CT-Aktivitäten im Stuhl von Normalpersonen deutlich höher als die T-Aktivitäten. Drückt man die Werte in ug Enzym pro g Stuhl aus, so liegen die Werte für CT im Stuhl ebenfalls höher (um 70 %) als für T. Das stimulierte Pankreas jedoch sezerniert ins Duodenum höhere T- als CT-Mengen (4, 19).
Größere T-Instabilität im Darmsaft gegenüber CT ist bekannt (55). Ob spezifische Inaktivatoren oder eine möglicherweise andersartige Stabilisierung aufgrund anderer

Partikelbindung mit für diesen Sachverhalt verantwortlich sind, bleibt offen. Jedoch ist diese geringere Stabilität des T vermutlich einer der Gründe für die geringere diagnostische Wertigkeit der T-Bestimmung gegenüber der CT-Bestimmung.
Ammann (4) meint aufgrund der Relation zwischen fäkaler CT- und T-Aktivität "gewisse Rückschlüsse" auf den Schweregrad der Insuffizienz ziehen zu können. Dies können wir anhand unserer Ergebnisse nicht bestätigen. So weist die einzige Stuhlprobe des Normalkollektives mit nach CT-Bestimmung falsch-pathologischem Ergebnis auch für T einen Wert im Pathologischen auf. Die eine nach CT-Bestimmung falsch-normale Stuhlprobe des Kollektives der Patienten mit sicherer ex. Pankreasinsuffizienz zeigt in der T-Bestimmung ein ebenfalls falsch-normales Ergebnis.
Von 15 Proben aller Patienten mit pathologischen CT-Ausscheidungswerten ohne Pankreasinsuffizienz hatten lediglich 3 Proben normale T-Werte. Alle 3 Patienten konnten jedoch bereits mit der routinemäßigen Doppelbestimmung für CT als falsch-pathologisch erkannt werden.
Aufgrund dieser Resultate sind wir in unserem Labor von der T-Bestimmung völlig abgekommen.

3.2.5 Doppelbestimmung:

Schon Ammann (4) weist auf die Möglichkeit hin, durch CT-Bestimmung in zwei Stuhlproben aus verschiedenen Stuhlentleerungen die Rate der falsch-pathologischen Ergebnisse zu vermindern. Durch Verwendung der Mittelwerte der CT-Konzentrationen dieser zwei Proben findet er im Normalkollektiv statt 20 % nur noch 10 % falsch-patholischer Werte. Er empfiehlt daraufhin eine zweite Probe dann auszuwerten, wenn die erste ein pathologisches Ergebnis zeigt.
Bei unseren Patienten ohne Anhalt für Pankreasinsuffizienz hatten 10 % mindestens einen falsch-pathologischen Wert, aber nur 1/3 dieser Patienten zeigten bei Mehrfachbestimmungen ausschließlich pathologische Ergebnisse.

Untersuchung von Proben verschiedener Entleerungen sind also unumgänglich, falls sich in einer ersten Probe eine pathologische CT-Konzentration findet. Darüber hinaus bleibt die Frage zunächst offen, ob durch prinzipielle Durchführung von Doppelbestimmungen auch die Zahl der falsch-normalen Ergebnisse, wie Dürr (13) sie gehäuft berichtet, zu senken sind. Wir führten praktisch alle Untersuchungen als Doppelbestimmung aus.

3.2.6 Verlaufskontrollen:

Eigene Ergebnisse sind im Rahmen der Beobachtung von Verlaufskontrollen noch nicht ausgewertet. Von Interesse wären Kontrollen einerseits bei Patienten mit bestimmten Erkrankungen (Verschlußikterus, alkoholischer Leberschädigung, alle Arten von Pankreasaffektionen, Zust. n. B_{II} und Pat. mit Diarrhoe), andererseits bei Patienten, welche mehrfach oder ausschließlich pathologische Ergebnisse aufweisen.

Erwähnenswert ist an dieser Stelle eine Verlaufsstudie von Ammann (3) bei chronisch Pankreaskranken. Anhand von 38 über Monate und Jahre kontrollierten Fällen kommt Ammann zum Schluß, daß die langfristige Stuhl-CT-Kontrolle Differenzierung zwischen regressiver und progressiver exokriner Pankreasinsuffizienzen gestattet. Schnelles Ansteigen pathologischer Stuhl-CT-Werte finden sich bei akut-reversibler, konstant tief-pathologische Werte bei chronisch-progressen Verläufen.

3.2.7 Fettbilanz und Stuhl-CT:

Läßt sich auch eine direkte Korrelation zwischen den Ergebnissen der Stuhlfettausscheidung und der CT-Ausscheidung in dem von uns untersuchten Kollektiv nicht nachweisen, so ermöglicht die zur Fettbestimmung zusätzliche CT-Ausscheidungsmessung einen guten Anteil der pathologischen Fettauscheidungen als nicht pankreatogen zu identifizieren. Wir bestimmten CT

nur in Einzelstuhlproben; es ist sicherlich sinnvoll an einer größeren Gruppe von Patienten mit Steatorrhoe parallel zur Fettausscheidungsbestimmung die CT-Ausscheidung in 72 - Std.-Sammelstühlen zu messen, um so den hohen Wert der CT-Ausscheidungsbestimmung für die Erkennung des Pankreas als Ursache der Störung zu sichern.

4. Schluß:

Obwohl durch die Ergebnisse von Dürr (13) erneut Zweifel an der Sicherheit der Methode entstanden sind, ist bei der Fülle der positiven Stimmen (3, 4, 6, 8, 11, 16, 17, 18, 24, 32, 33, 34, 42, 50) bei nur wenigen Stimmen mit stark einschränkendem Urteil (7, 53) der klinische Wert in der Pankreasdiagnostik nicht zu übersehen.
Besonders für die Diagnostik ausgegrägter exokriner Pankreasinsuffizienzen ist der Wert der Methode heute wohl nicht mehr zu leugnen. Auch behält die Methode mit den nötigen Einschränkungen bei leichteren Insuffizienzen ihre Suchtest-Funktion.

Eindeutige Vorteile der Stuhlenzymbestimmung sind die geringe Belastung des Patienten, daher die Möglichkeit häufiger Kontrolluntersuchungen und andererseits Untersuchung größerer Kollektive. So kann u. U. besserer Einblick in Grad der Häufigkeit von Pankreasbeteiligung im Rahmen anderer Erkrankungen gewonnen werden. Verlaufskontrollen sind möglich. Postversand ermöglicht Untersuchung in routinierten Zentrallabors. Auch bieten der verhältnismäßig geringe Preis und die befr. Reproduzierbarkeit alle Voraussetzungen für weite Verbreitung des Testes. Die Geruchsbelästigung ist kaum größer als die der üblichen Stuhluntersuchung auf okkultes Blut.

Zur Problematik des S-P-T als Kriterium für die Treffsicherheit des Testes ist Stellung genommen worden. Ob die Untersuchung bei nicht stimuliertem Organ nur Nachteile bietet, bleibt offen.

Neben den noch bestehenden Widersprüchen in Bezug auf den Wert des Testes im klinischen Bereich stellt auch die Standardisierung der Methode eine für die Zukunft wichtige Aufgabe dar. Noch immer wird unter verschiedensten Bedingungen (pH, Meß-Temperatur, Substratkonzentration etc.) gearbeitet. Die Unterschiede im Verhalten von Stuhl zu Stuhl (pH-Optima, Partikelbindung, Haltbarkeit der Enzyme) bringt mit sich, daß solchen Untersuchungen größere Patientengruppen zugrunde gelegt werden müssen.

Soll die Methode neu eingeführt werden, so empfiehlt sich eigene Normalwerte zu ermitteln. Mit einer weitergehenden allgemeinen Standardisierung wird dies entfallen können. Angaben der Aktivitäten in IU vermeiden den Schritt der Eichung mit tierischem Enzym und damit eine mögliche Fehlerquelle. Zur Bewertung der Ergebnisse ist eine Zuordnung zum klinischen Bild unumgänglich. Auch muß das Einzelergebnis in den Verlauf der Erkrankung eingeordnet werden. Patienten mit Verschlußikterus, Zust. n. B_{II} und solchen mit starker Kachexie wird man besondere Aufmerksamkeit widmen müssen. Bei pathologischem Ausfall des Testes und bei Patienten mit voluminösen Stühlen bzw. Diarrhoen müssen eventuell Sammelstuhluntersuchungen angeschlossen werden. Selbst Doppelbestimmungen können bei Grenzbefunden oft zur Klärung nicht ausreichend sein, sollten jedoch am besten generell durchgeführt werden. Zusätzliche T-Bestimmung liefert nach unseren Erfahrungen keine weitere Information.

Ob eventuell eine Lipase-Bestimmung im Stuhl in Zukunft die enttäuschende T-Bestimmung ersetzen kann, ist noch nicht abzusehen. Aufgrund des Phänomenes der Enzymdissoziation könnte Bestimmung mehrerer Enzyme im Stuhl die Treffsicherheit der Methode durchaus erhöhen.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S :

1. ADHAM, NF, DYCE, B.J., GEOKAS, M.C., HAVERBACK, B.J.
Editional - Stool chymotrypsin and trypsin determination. Amer. J. Dig. N.S. 12 (1967) 1272-1276.

2. AMMANN, R.
Die moderne Stuhlenzymmethode
aus: Engelhardt, A. u. Lommel, H. (Hrsg.): Method. Fortschritte im med. Laboratorium - Malabsorption-Maldigetion, Weinheim, 1974, S. 193 - 200.

3. AMMANN, R.
Die Differenzialdiagnose zwischen akut-reversibler und chron.-progressiver Pancreatitis.
Schweiz. med. Wschr. 98, (1968), 744 - 755.

4. AMMANN, R.
Fortschritte in der Pankreasfunktionsdiagnostik
Springer - Berlin, Heidelberg, New-York - 1967.

5. AMMANN, R., DYCK, W., ROSENMUND, H. und BEN AVRAHAM, R.
Bestimmung der Trypsin und Chymotrypsin-Aktivität im Stuhl. Eine sensible, spezifische Methode zum Nachweis der exokrinen Pankreasinsuffizienz.
Klin. Wschr. 42 (1964) 553-555.

6. AMMANN, R. W., TAGWERCHER E., KASHIWAGI, H. und ROSENMUND, H.
Diagnostic value of fecal chymotrypsin and trypsin assessment for detection of pancreatic disease.
A comparative study.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 13 (1968) 123-146.

7. BANWELL, J. G., LEONHARD, P.J., LOBO, R. M.
Measurement of trypsin and chymotrypsin activity in stools to detect chronic pankreatic disease.
Gut 6 (1965) 143 - 145.

8. BARBERO, G.J., SIBINGA, M. S., MARINO, J. M. and SEIBEL, R.
Stool trypsin and chymotrypsin value in the diagnosis of pancreatic insufficiency in cystic fibrosis.
Dis. Child. 112, (1966) 536

9. BORNSTEIN, W., GOLDMANN, F.L., OTTE, M.
Methodik und weitere klinische Erfahrungen mit dem Peptid-PABA-Test, einem neuen, indirekten Pankreasfunktionstest.
Vorgetragen auf d. 82. Tag. d. deutschen Ges. Inn. Med., Wiesbaden 1976.

10. BORGSTRÖM, B., DAHLQUIST, A., GUSTAFSON, E., LUNDH, G. and MALMQUIST, J.
Trypsin, invertase und amylase content of feces of germfree rats.
Proc. Soc. exp. Biol. 102 (1959) 154 - 155.

11. BRÜGGEMANN, E., ROHDE, L., TÖWE, J. u. TECHMANN, W.
Kritische Untersuchungen zur diagnostischen Bedeutung der Chymptrypsinbestimmung bei Pankreaserkrankungen
Dtsch.-Zeitschrift für Verdauungsstoffwechselkrankheiten: 33 (1973) 223-225.

12. CREUTZFEDT, W.
Funktionsdiagnostik bei Erkrankungen des exokrinen Pankreas.
Verh. deutsche Ges. inn. Med. 70 (1964) 781.

13. DÜRR. H-K., OTTE, M., FORELL, M.M., BODE, J. CH.
Kontrollierte Studie zur diagnostischen Wertigkeit der Chymptrypsinbestimmung im Stuhl.
Verh. dtsch.Ges. inn. Med. 80 (1974) 546 - 548.

14. DÜRR, H.-K., SCHNEIDER, R. und DÜRR, J. CH.
Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl zur Erfassung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz.
Symposion: "Die Untersuchung der Bauchspeicheldrüse", Hamburg Dezember 1975.

15. DÜRR, H.-K., SCHNEIDER, R. and BODE, J.CH.
Fecal chymotrypsin: Studies on some characteristics of the enzym.
Digestion 17 (1978) 396 - 403

16. DYCK, W.P.
Titrimtric measurement of fecal trypsin and chymotrypsin in cystic fibrosis with pancreatic exokrine insufficiency
Amer. J. Dig. Dis. N.S. S. 12 (1967) 310 - 317.

17. DYCK, W.P., AMMANN, R.
Quantitative determination of fecal chymotrypsin as a screening test for panreatic exocrine insufficiency.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 10 (1965) 530 - 544.

18. FREUDIGER, U., BERGER, G.
Über die Bestimmung der Trypsin- und Chymotrypsinaktivität im Kot von Hunden und ihre Bedeutung für die Diagnose der chronischen exokrinen Pankreasinsuffizienz.
Schweiz. Archiv f. Tierheilkunde 113 (1971) 169 - 183.

19. GOEBELL, H.
Zum Sekretionsverhalten der normalen und geschädigten Bauspeicheldrüse.
Habilitationsschrift, Marburg 1969.

20. GOEBELL, H., BODE, CH., LEPPLER, U., MARTINI, G.A.
Funktionsuntersuchungen des exokrinen Pankreas bei Leberzirrhosen verschiedener Ätiologie, Hämochromatosen und nach portocavalem Shunt.
Acta hepatosplenol. (Stuttg.) 18 (1970), 437 - 452.

21. GOLDBERG, D.M., CAMPBELL, R. and ROY, A. D.
Binding of trypsin and chymotrypsin by human intestinal mucosa.
Biochim. Biophys. Acta 167 (1968) 613 - 615.

22. GOLDBERG, D.M., CAMPBELL, R., and ROY, A.D.
Fate of trypsin and chymotrypsin in the human small intestine
Gut 10 (1969) 477-483.

23. GOLDBERG, D. M., CAMPBELL, R. and ROY, A.D.
The interaction of trypsin and chymotrypsin with intestinal cells in man and several animal species.
Comp. Biochem. Physiol. 38 B (1971) 697 - 706.

24. GOLDBERG, D.M., MC ALLISTER, R.A. and ROY, A. D.
Studies on human intestional proteolysis.
Scand. J. Gastroenterol. 3 (1968) 193 - 201.

25. GROSSMAN, M. I.
Fecal enzymes of dogs with pancreatic exclusion.
Proc. Soc. exp. Biol. 110 (1962) 41 - 42.

26. HAASE, H.
Über eine modifizierte Methode des Sekretin-Pankreozymin-Testes - Erfahrungen an Gesunden, chronischen Alkoholikern und Patienten mit Leberzirrhose.
Dissertationsschrift, Marburg 1974.

27. HAVERBACK, B.J., DYCE, B.J., GUTENBERG, PH.J., MONTGOMERY, D.W.
Measurement of trypsin and chymotrypsin in stool.
Gastroenterology 44 (1963) 588 - 597.

28. KAFFARNIK, H. MEYER-BERTENRATH, J. G.
Zur Methodik und klinischen Bedeutung eines neuen Pankreaslipase-Test mit Fluoresceindilaurinsäureester.
Klin. Wschr. 47 (1969) 221 - 223.

29. KAUFMANN, S., NEURATH, H. u. SCHWERT, G.W.
The specific peptidase and esterase activities of chymotrypsin.
J. Biol. Chem. 177 (1949), 793 - 814.

30. LAGERLÖFF, H. O.
Pancreatic function and pancreatic disease.
Acta med. Scand., Suppl. 128 (1942).

31. LÖFFLER, A., ERNST, R., MIEDERER, S.E., STADELMANN, O.
Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl mit Succinyl-L-Phenylalanin-P-Nitraliniden (Suphepa) in der Diagnostik von Pankreaserkrankungen.
Med. Klin. 70 (1975) 1755 - 1758.

32. MOELLER, D.D., DUNN, G.D., KLOTZ, A.P.
Diagnosis of pancreatic exokrine insufficiency by fecal chymotrypsin activity.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 18 (1973) 792 - 796.

33. MOELLER, D.D., DUNN, G.D. and KLOTZ, A.P.
Fecal chymotrypsin in alcoholic liver disease.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 19 (1974) 1138 - 1142.

34. MULLER, L., WISNIEWSKI, Z.S., HANSKY, J.
The measurement of fecal chymotrypsin. A screening test for pancreatic exocrine insufficiency.
Aust. Ann. Med. 1970/I 47 - 49.

35. MULLINGER, M., PALAST, P.
Tryptic and chymotryptic activity of stools of newborn infants.
Pediatrics 38 (1966) 657 - 659.

36. NAGEL, W., WILLIG, F., PESCHKE, W. und SCHMIDT, F.H.
Über die Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin mit Aminosäuren-p-nitroaniliden.
Hoppe-Seylers Zeitschrift f. physiol. Chem. 340 (1965) 1-10.

37. NEURATH, H. and SCHWERT, G.W.
The mode of action of the crystalline pancreatic proteolytic enzymes.
Chem. Rev. 46 (1950) 69 - 153.

38. PARKS, R.E. u. PLANT, G.W.E.
A manometric assay for chymotrypsin.
J. biol. Chem. 203 (1953) 755 - 761.

39. PELOT, D. and GROSSMAN, M.I.
Distribution and fate of pancreatic enzymes in small intestine of the rat.
Amer. J. Physiol. 202 (1962) 285 - 288.

40. RICK, W.
Zur Pathologie der Enzymsekrtio des Pankreas.
Acta gastroent. belg. 28 (1965) 389.

41. ROY, A.D., CAMPBELL, R., and GOLDBERG, D.M.
Effect of diet of the trypsin and chymotrypsin output in the stools of patients with an ileostomy.
Gastroenterology 53 (1967) 584 - 589.

42. SALE, J.K, GOLDBERG, D.M., THJOLDLEIFSSON, B. and WORMSLEY, K.G.
Trypsin and chymotrypsin in duodenal aspirate and faeces in response to secretin and cholecystokinin-pankreozymin.
Gut 15 (1974) 132 - 138.

43. SARLES, H., PASTOR, J., PAULI, A. and BARTHELEMY, M.
Determination of pancreatic function.
Gastroenterologia 99 (1963) 279.

44. SCHLECHT, H.
über eine einfache Methode zur Prüfung der Pankreasfunktion beim gesunden und beim kranken Menschen.
Münch. med. Wschr. 55 (1908) 725

45. SCHNEIDER, R., DÜRR, H.K. und BODE, J. CH.
Diagnostische Wertigkeit der Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl für die Erfassung einer exokrinen Pankreasinsuffizienz.
Dtsch. Med. Wschr. 99 (1974) 1449 - 1454.

46. SCHNEIDER, R., DÜRR, H.K., und BODE, J. CH.
Bestimmung von Chymotrypsin im Stuhl als Suchtest für eine exokrine Pankreasinsuffizienz: Untersuchungen zur Zuverlässigkeit verschiedener Methoden.
Vortrag d. 82. Tag. d. dtsch. Ges. inn. Med., Wiesbaden 1976.

47. SCHNEIDER, R., DÜRR, H.K. und BODE, J. CH.
Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin im Stuhl als Suchtest für eine exokrine Pankreasinsuffizienz.
Verh. dtsch. Ges. inn. Med. 79 (1973) 859 - 861.

48. SCHWERT, G.W., NEURATH, H., KAUFMANN, S. and STOKE, J.E.
The specific esterase activity of trypsin.
J. biol. Chem. 172 (1948) 221- 239.

49. SMITH, H.E., BARTRUM, R.J., CHANG, Y.C., D´ORST, C.J., LOKICH, J., ABBRUZZESE, A. and DANTONO, J.
Percutaneous aspiration biopsy of the pankreas under ultrasonic guidance.
New engl. J. Medic. 17 (1975) 825 - 828.

50. SMITH, J.S., MULLINGER, M.A. and BOGOCH, A.
Fecal chymotrypsin and trypsin determinations.
Canad. med. Ass. J. 104 (1971) 691 - 697.

51. VAN DE KAMER, J. H., TEN BOKKEL HUINIK, H., WEYERS, H.A.
Rapid method for the determination of fat in feces.
J. biol. Chem. 177 (1949) 347.

52. VAN GOIDSENHOVEN, G.E., HENKE, J. VACCA, J.B. and KNIGHT, W.A.
Pancreatic function in cirrhosis of the liver.
Amer. J. Dig. Dis. 8 (1963) 160 - 173

53. WILDING, P. BANWELL, J.G., COOKE, W.T.
Fecal enzyme assay as an aid to the diagnosis of pancreatic exocrine insufficiency.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 11 (1966) 722 - 722.

54. WILLIG, F. und KÖRBER, W.
Eine Methode zur Bestimmung von Trypsin und Chymotrypsin im Stuhl mit Aminosäure-p-nitroaniliden.
Z. Gastroenterologie 5 (1967) 33 - 36.

55. WOHLMANN, A., KABACOFF, B.C. and AVAKIAN, S.
Comperative stability of trypsin and chymotrypsin in human intestinal juice.
Proc. Soc., exp. Biol. 109 (1962) 26 - 28.

56. WORNING, H. and MÜLLERTZ, S.
pH and pancreatic enzymes in the human duodenum during digestion of a standard meal.
Scand. J. Gastroent. 1 (1966) 268.

57. YOUNG, G.R., AGNEW, J.E., LEVIN, G.F. and BOUCHIER,I.A.D
Radioselenium in duodenal aspirate as an assessment of pancreatic exocrine function.
British Med. J. 2 (1971) 252 - 255.

58. ZIEVE, L. and MULFORD, B.
Secretion of pankreatic enzymes.
Amer. J. Dig. Dis. N.S. 12 (1967) 303 - 309.

DANKSAGUNG:

Mein besonderer Dank gilt Herrn
Professor Dr. med. J. Ch. Bode
für die Anregung zu dieser Arbeit
und für die freundliche Beratung.

Herrn Dipl.-Biochem. Dr. med. H.K. Dürr
danke ich für sein stetes Interesse an
dieser Arbeit und die unermüdliche Unter-
stützung.

Mein Dank gilt auch Herrn Professor
Dr. med. Dölle, Vorstand der Abteilung
Innere Medizin I der Medizinischen
Klinik der Universtität Tübingen,
für das freundliche Überlassen von
Patienten seines Krankengutes.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen
Frau Gamon und Frau Junk danke ich für
manche bereitwillige Hilfe.

LEBENSLAUF:

Am 19. Januar 1950 wurde ich als Sohn des Friseurmeisters Kurt Schneider und seiner Ehefrau Lina geb. Weirich in Frankenberg an der Eder geboren.

Grundschule und Gymnasium besuchte ich am Heimatort. Nach der Reifeprüfung nahm ich zum Wintersemester 1968/69 das Studium der Medizin in Marburg/Lahn auf. Im Sommersemester 1972 setzte ich mein Studium in Tübingen fort. Im gleichen Sommer begann ich im Stoffwechsellabor der Medizinischen Klinik der Universität Marburg unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. Bode mit der Arbeit an meinem Dissertationsthema. Im Januar 1975 legte ich in Tübingen mein medizinisches Staatsexamen ab.

Am 14.2.1975 heiratete ich die Studentin der Philologie Hanna Renate, geb. Hausen.

Als Medizinalassistent arbeitete ich in der Medizinischen Universitätsklinik in Marburg, in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Soltau/Niedersachsen und in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses in Frankenberg/Eder. Seit 1.5.1976 bin ich als Assistent in der gynäkologisch-geburtshilflischen Abteilung des Marienhospitales in Stuttgart tätig.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:

Daume, Dimroth, Dölle, Engelhardt, Friedrich, Hammelmann, Hensel , Hort, Karlson, Koecke, Korb, Nöth, Oepen, Petry, Pots, Rodeck, Rohen, Scriba, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Thoenes, Walcher, Wendt, Wehrmeyer.

in Tübingen die Herren Professoren und Dozenten:

Apitz, Aulhorn, Bachmann, Bader, Bierich, Dölle, Durst, Eggstein, Fichte, Finzen, Fischer, Frommhold, Göbel, Harms, Heni, Hirschmann, Kidess, Kochsiek, König, Koslowski, Kossel, Kretschmer, Kummer, Lang, Lempp, Loch, Mallach, Mau, Menzel, Nikolowski, Pfeifer, Pflug, Plester, Probst, Roemer, Schindler, Schneider, Unbehaun, Waller, Weichardt.

ERKLÄRUNG:

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: Bestimmung von Chymotrypsin und Trypsin im Stuhl als Suchtest für eine exokrine Pankreasinsuffizienz: Untersuchungen zur methodischen Brauchbarkeit und klinischen Wertigkeit des Testes, in der Medizinischen Klinik der Universität unter Leitung von Herrn Professor Dr. Bode mit Unterstützung durch Herrn Dipl.-Biochem. Dr. Dürr ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 30. 12. 1976

Reinhold Schneider

Citydruck · Haugerglacisstraße · 8700 Würzburg